Berlin 1976

IN V I T R O UND IN V I V O AFFINITÄTS-MARKIERUNG VON BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS RIBOSOMEN MIT CHLORAMPHENICOL UND PUROMYCIN ANALOGA

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereiches Pharmazie

vorgelegt von

Georg Wischnath

aus

Gütersloh

1976

1. Gutachter: Professor Dr. H.G. Wittmann

2. Gutachter: Professor Dr. H. Fenner

3. Gutachter: Professor Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 6.7. 1976

IN V I T R O UND IN V I V O AFFINITÄTS-MARKIERUNG VON BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS RIBOSOMEN MIT CHLORAMPHENICOL UND PUROMYCIN ANALOGA

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereiches Pharmazie

vorgelegt von

Georg Wischnath

aus

Gütersloh

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547617_0029

Diese Arbeit wurde in der Zeit von September 1973 bis März 1976 am Max Planck Institut für Molekulare Genetik in der Abteilung und unter Aufsicht von Herrn Prof. H.G. Wittmann durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.
Herrn Dr. V.A. Erdmann und Herrn Dr. O. Pongs danke ich besonders für fördernde Kritik und stetige Unterstützung.
Herrn O. Bahn und Herrn D. Kamp danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Zonalzentrifugation und der zweidimensionalen Elektrophorese. Allen Mitarbeitern des Institutes, die mir Proben zur Verfügung gestellt haben, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.
Herrn Dr. G.W. Tischendorf und Herrn Dr. G. Stöffler danke ich für die freundliche Überlassung der Abb. 1, Herrn Dr. K.H. Nierhaus für die Überlassung der Abb. 2 und Herrn Dr. V.A. Erdmann für die Überlassung der Abb. 3 in dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1. Struktur des Ribosoms	1
1.2. Funktion des Ribosoms	4
1.3. Affinitäts - Markierung	9
1.4. Problemstellung	11
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Standard Puffer, Lösungen, Materialien und Geräte	13
2.1.1. Standard Puffer und Lösungen	13
2.1.2. Materialien	15
2.1.3. Geräte	17
2.2. Synthesen	18
2.2.1. Synthese von N-Jod- 2-[^{14}C] - acetyl-puromycin	18
2.2.2. Synthese von Monojod [^{14}C] amphenicol	19
2.3. Anzucht von Bacillus stearothermophilus Stamm 799	20
2.4. Präparation von Ribosomen	21
2.4.1. 70S Ribosomen	21
2.4.2. Waschen von Ribosomen	23
2.4.3. Präparation von 50S - und 30S Untereinheiten	23
2.5. Inkubation von 70S Ribosomen mit N-Jod 2-[^{14}C] acetylpuromycin	24
2.6. Auftrennung und Charakterisierung ribosomaler Proteine	25

2.6.1. Proteinextraktion aus Ribosomen 25

2.6.2. Elektrophorese ribosomaler Proteine in Polyacrylamid-N-Lauroyl -Sarkosin Gelen 26

2.6.3. Elektrophorese ribosomaler Proteine in Polyacrylamid-N-Lauroyl Sarkosin Gradienten Gelen 27

2.6.4. Zweidimensionale Polyacrylamid - Gel Elektrophorese von ribosomalen Proteinen 27

2.7. Methoden zur Bestimmung der biologischen Funktion ribosomaler Partikel 28

2.7.1. Polyuridylsäure-abhängige Polyphenylalanin Synthese Poly (U) - System 28

2.7.2. Proteinsynthese im natürlichen f2 - Phagen RNS System 29

2.7.3. Bestimmung der Peptidyltransferaseaktivität mit Hilfe der "Fragment-Reaktion" 30

2.7.4. Bindung der tRNS 3' - End Fragmente C-A-C-C-A[^{3}H] Leu und C-A-C-C-A[^{3}H] Leu Ac 31

2.7.5. Bestimmung der ATP- und GTP-Hydrolyseaktivität 31

2.8. In v i v o Reaktion von Monojodamphenicol mit B. stearothermophilus 799 32

2.8.1. Anzucht von B. stearothermophilus 799 für die in v i v o - Markierung mit Monojodamphenicol und Wachstumskontrollen 32

2.8.2. Protein- und DNS- Syntheseraten bei B. stearothermophilus unter Einfluß von Chloroamphenicol und Monojodamphenicol 33

2.8.3. Inkubation von B. stearothermophilus 799 mit Monojod-[^{14}C]amphenicol 33

2.8.4. Proteinextraktion aus in v i v o markierten B. stearothermophilus Kulturen 34

3. ERGEBNISSE

3.1. Reaktion von 70S Ribosomen mit N-Jod-2-[^{14}C] acetylpuromycin 35

3.2. Reaktion von 70S Ribosomen mit Monojod [^{14}C] amphenicol 38

3.3. Gradientenanalyse von modifizierten 70S Ribosomen 40

3.4. Elektrophoretische Analyse von modifizierten ribosomalen und Überstands-Proteinen 44

3.5. Funktionsanalyse chemisch modifizierter Ribosomen 53

3.6. Reaktion von Monojodamphenicol mit B. stearothermophilus 57

3.6.1. Effekt von Monojodamphenicol und Chloramphenicol auf die in v i v o Protein- und DNS Synthese 57

3.7. Reaktion von Monojod [^{14}C]amphenicol mit B. stearothermophilus 62

3.8. Analyse der Proteinfraktionen, die Monojod [^{14}C] amphenicol gebunden hatten 63

4. DISKUSSION 66

5. ZUSAMMENFASSUNG 79

6. ABKÜRZUNGEN 80

7. LITERATURVERZEICHNIS 83

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. Struktur des Ribosoms

Über Struktur und Funktion des Ribosoms sind in jüngster Zeit eine Reihe von Büchern und Übersichtsartikeln erschienen (Bosch, 1972; Nomura, Lengyel & Tissières, 1974; Wittmann, 1976; Garrett & Wittmann, 1973; Pongs, Nierhaus, Erdmann & Wittmann 1974; Haselkorn & Rothman-Denes, 1973). Daher soll hier nur ein kurzer Überblick gegeben werden.

Der Ort der Proteinbiosynthese in allen Organismen sind Ribosomen. Sie werden durch ihr Sedimentationsverhalten während der Gradientenzentrifugation in ihrer Größe unterschieden. Prokaryontische Ribosomen haben einen Sedimentationskoeffizienten von 70S und eukaryontische Ribosomen einen Koeffizienten von 80S. Ribosomen zerfallen im zellfreien Extrakt bei niedriger Magnesiumsalzkonzentration (unter 10^{-3}M) in zwei Untereinheiten, und zwar 80S - Ribosomen in 40S - und 60S und 70S Ribosomen in 30S - und 50S - Partikel. Die Proteinbiosynthese kann nur stattfinden, wenn beide Untereinheiten zusammen mit der mRNS vereint sind.

Das zur Zeit am besten erforschte Ribosom ist das von Escherichia coli (E. coli). Für vergleichende Studien mit den Ribosomen von E.coli wurden bisher häufig Ribosomen von Bacillus stearothermophilus (B. stearothermophilus, Bacillaceae) verwendet, die auch in dieser Arbeit untersucht werden sollten.

Die 50S Untereinheit von E. coli besteht aus insgesamt 34 Proteinen und einer 23S RNS sowie einer 5S RNS. Die Zusammensetzung der B. stearothermophilus 50S Untereinheit ist bis auf die Anzahl der Proteine der von E. coli Untereinheiten ähnlich; die Proteinfraktion besteht hier aus 27 bzw. 28 Proteinen (Cohlberg & Nomura, 1976).

Die 30S Untereinheit besteht bei beiden Spezies aus einer 16S RNS und 21 Proteinen.

Die Nomenklatur der Proteine richtet sich nach Art der Spezies und der ribosomalen Untereinheit, aus der sie stammen. "E" steht für E. coli und "B" für B. stearothermophilus. "L" bedeutet "large" = große Untereinheit und "S" bedeutet "small" = kleine Untereinheit. Die Numierung erfolgt nach dem Wanderungsverhalten in der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese von Kaltschmidt und Wittmann (1970), wobei die Proteine von links nach rechts in Zeilen von oben nach unten gezählt werden, z.B. B-L10 = Protein Nr. 10 von der B. stearothermophilus 50S Untereinheit.

In den letzten Jahren hat es große Fortschritte bei der Struktur und Funktionsaufklärung des Ribosoms gegeben. Dabei kamen eine Vielzahl von Methoden zur Anwendung (Wittmann, 1976). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Komplexen aus Antikörpern gegen einzelne ribosomale Proteine und jeweils zwei gleichartigen ribosomalen Untereinheiten ließen erst kürzlich die Bestimmung der Strukturen der großen und kleinen Untereinheit von E. coli zu, die in Abb. 1 wiedergegeben sind.

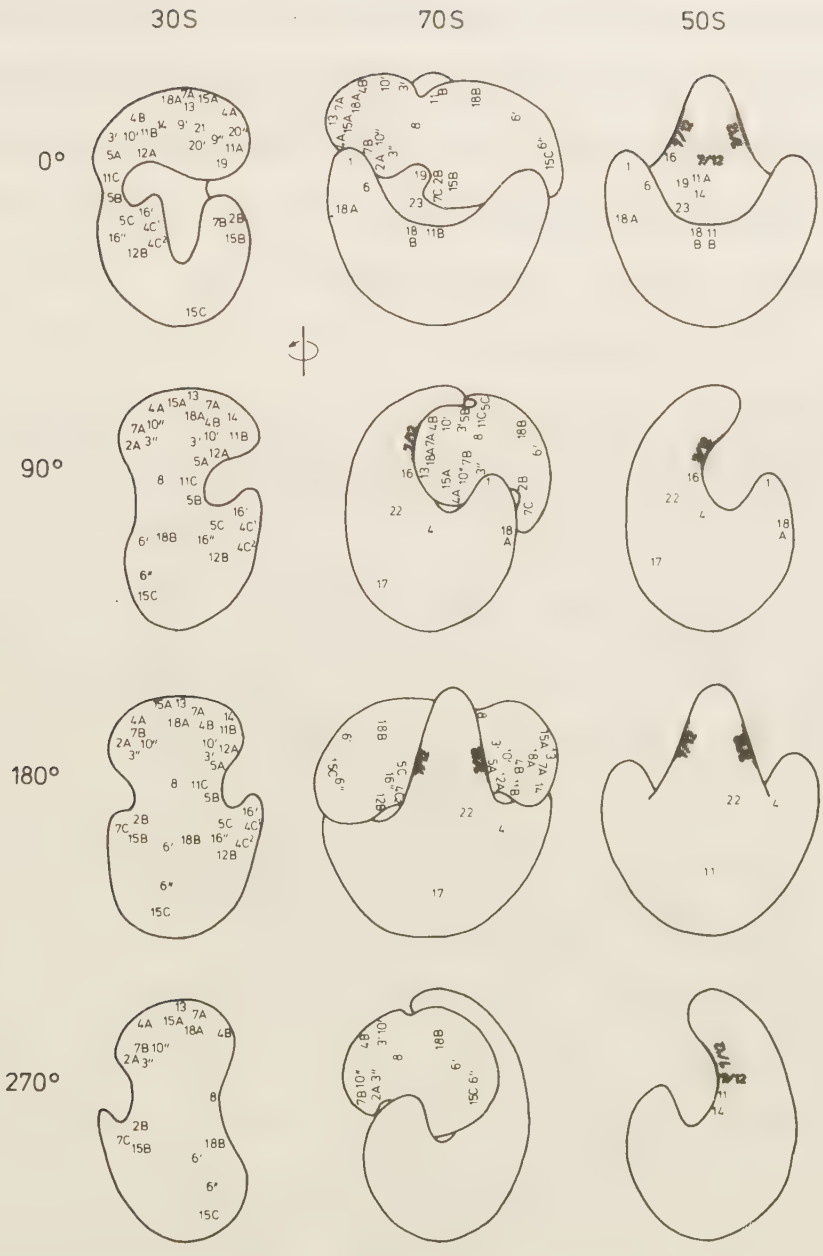


Abb. 1 Dreidimensionales Strukturmodell des E. coli 30 S-, 50S- und 70S Ribosoms. Mehrfache Bindungsstellen für einen Antikörper sind durch Großbuchstaben bzw. ' und " gekennzeichnet. Einzelheiten werden in der Arbeit von Tischendorf, Zeichardt & Stöffler (1975) wiedergegeben.

1.2. Funktion des Ribosoms: Die Proteinbiosynthese

Die Aminosäuresequenz der Proteine wird durch die Basensequenz der DNS der Zelle bestimmt. Die in Form von Triplettcodes in der Basensequenz der DNS verschlüsselte genetische Information wird in zwei Stufen übersetzt. Zunächst wird die DNS-Sequenz in ein Genzwischenprodukt, die mRNS umgeschrieben. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transkription. Am Ribosom wird dann die transkribierte Information in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt. Dieser Vorgang heißt Translation und wird in drei Abschnitte gegliedert:

1. Start der Polypeptidkette = Initiation
2. Verlängerung der Polypeptidkette = Elongation
3. Abschluß der Polypeptidkette = Termination

Während der Synthese eines Proteins durchläuft das Ribosom einen Zyklus, nach welchem es für die Synthese eines neuen Proteins wieder bereitsteht. Wenn am Ribosom kein Protein synthesiert wird, dissoziiert es in seine Untereinheiten. Zumeist sind mehrere Ribosomen gleichzeitig auf einem mRNS - Strang aufgereiht, und sie übersetzen dessen Information in Proteine. Diese komplexen Formen nennt man Polysomen. Eine schematische Darstellung des Ribosomenzyklus während der Proteinsynthese ist in Abb. 2 wiedergegeben.

Initiation: Für den Start der Proteinsynthese bei E. coli existiert ein definiertes Signal auf der mRNS, das Initiationstriplett AUG oder GUG. Es codiert die Bindung einer spezifischen Methionin-beladenen - tRNS, die am N - terminalen Ende der Aminosäure formyliert ist. Man nennt diese beladene tRNS deshalb:

N-Formyl-Met-tRNS$_F^{Met}$ (fMet-tRNS$_F^{Met}$) und die unbeladene Form: tRNS$_F^{Met}$. Daneben existiert in der Zelle aber eine weitere Methionin aktivierende tRNS (im beladenen Zustand Met-tRNS$_M^{Met}$). Sie sorgt für den Einbau von Methionin in das Innere einer Polypeptidkette. Die beiden tRNS-Arten unterscheiden sich in ihrer Sekundärstruktur und möglicherweise auch in ihrer Tertiärstruktur.

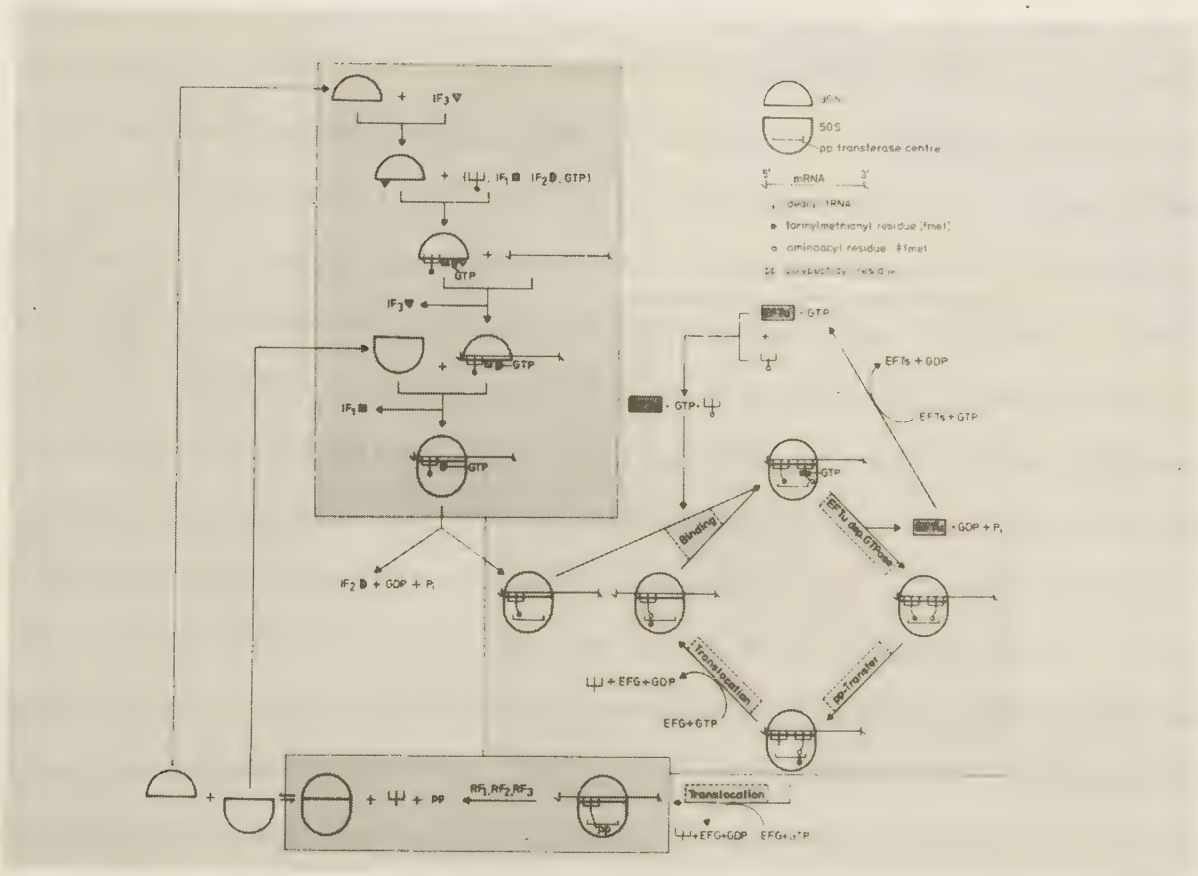


Abb. 2 Schema der Proteinbiosynthese bei E. coli. Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Mit Hilfe dreier Initiationsfaktoren und GTP wird aus der 30S Untereinheit, mRNS und N-Formylmethionin-tRNS$_F^{Met}$ der sog. 30S - Initiationskomplex gebildet. Die darauffolgende Anlagerung der 50S Untereinheit bildet den 70S - Initiationskomplex. Die Initiation ist beendet durch Dissoziation des Initiationsfaktors IF-2 und Hydrolyse von GTP (Abb. 2).

Elongation: Nach der Dissoziation der drei Initiationsfaktoren, bindet der 70S - Initiationskomplex einen "ternären Komplex", der aus Aminoacyl - tRNS (aa - tRNS), dem Elongationsfaktor EF-Tu und GTP besteht (Abb. 2). Dieser Komplex bindet in der ribosomalen "A - site" (Aminoacyl -tRNS Bindungsstelle des Ribosoms), wobei das Anticodon der aa- tRNS in Wechselwirkung mit dem komplementären Triplett auf der mRNS tritt. Welche spezielle aa-tRNS jeweils in der "A - site" bindet, wird allein durch das in der "A - site " befindliche Codon der mRNS bestimmt. Nach der Hydrolyse von GTP im "ternären Komplex", dissoziieren der Faktor EF-Tu und GDP vom Ribosom. Ein weiterer Elongationsfaktor EF-Ts ist notwendig, um EF-Tu - GTP zu regenerieren. Ein auf der 50S Untereinheit lokalisiertes Enzym, das Peptidyltransferase genannt wird, katalysiert nun die Peptidbindung zwischen der Aminosäure der aa - tRNS und der Aminosäure der Initiations - tRNS, deren ribosomale Bindungsstelle "P - site" (Peptidyl - tRNS Bindungsstelle) heißt (Abb. 2). Nach der Herstellung der Peptidverbindung ist der Formyl-Methionin Rest der Initiations - tRNS kovalent an die Aminosäure der entsprechenden aa - tRNS in der "A - site" gebunden. Um nun die "A - site" für die Bindung eines neuen "ternären Komplexes" freizumachen, muß der Translokationsschritt

vollzogen werden. Dabei wird die das Dipeptid tragende tRNS, auch Peptidyl-tRNS genannt, von der "A-site" in die "P - site" übertragen, und die deacylierte tRNS verläßt das Ribosom. Der Translokationsschritt ist an die Spaltung von GTP und die Gegenwart eines weiteren Elongationsfaktors EF-G gebunden. Nach der Translokation und der Hydrolyse von GTP dissoziieren EF-G und GTP vom Ribosom, und der nächste Elongationszyklus kann stattfinden.

Termination: Die Proteinsynthese wird beendet, wenn eines der drei **Terminationstripletts** UAG, UAA oder UGA in die ribosomale "A - site" gelangt, weil es keine aa - tRNS gibt, die durch diese Tripletts codiert wird (Abb. 2). Die Abspaltung des neu synthetisierten Proteins erfolgt in Gegenwart von drei Releasefaktoren RF-1, RF-2, RF-3, von denen RF-1 an die Terminationscodons UAA und UAG und RF-2 an UAA und UGA binden. RF-3 und GTP stimulieren den Terminationsprozeß, der durch die Dissoziation des Ribosoms - mRNS - Peptidyl-tRNS Komplexes beendet wird.

Die Zuordnung einiger ribosomaler Komponenten an dem beschriebenen Proteinsynthes-Zyklus ist in jüngster Zeit mit verschiedenen Methoden ermöglicht worden. Die vorläufigen Ergebnisse für das E.coli Ribosom sind schematisch in Abb. 3 dargestellt. Die wesentlichen Methoden dabei waren die Partial- und Totalrekonstitution, die Verwendung von Antikörpern gegen spezielle ribosomale Proteine und deren Effekt auf Teilfunktionen des Ribosoms sowie die Affinitäts-Markierung.

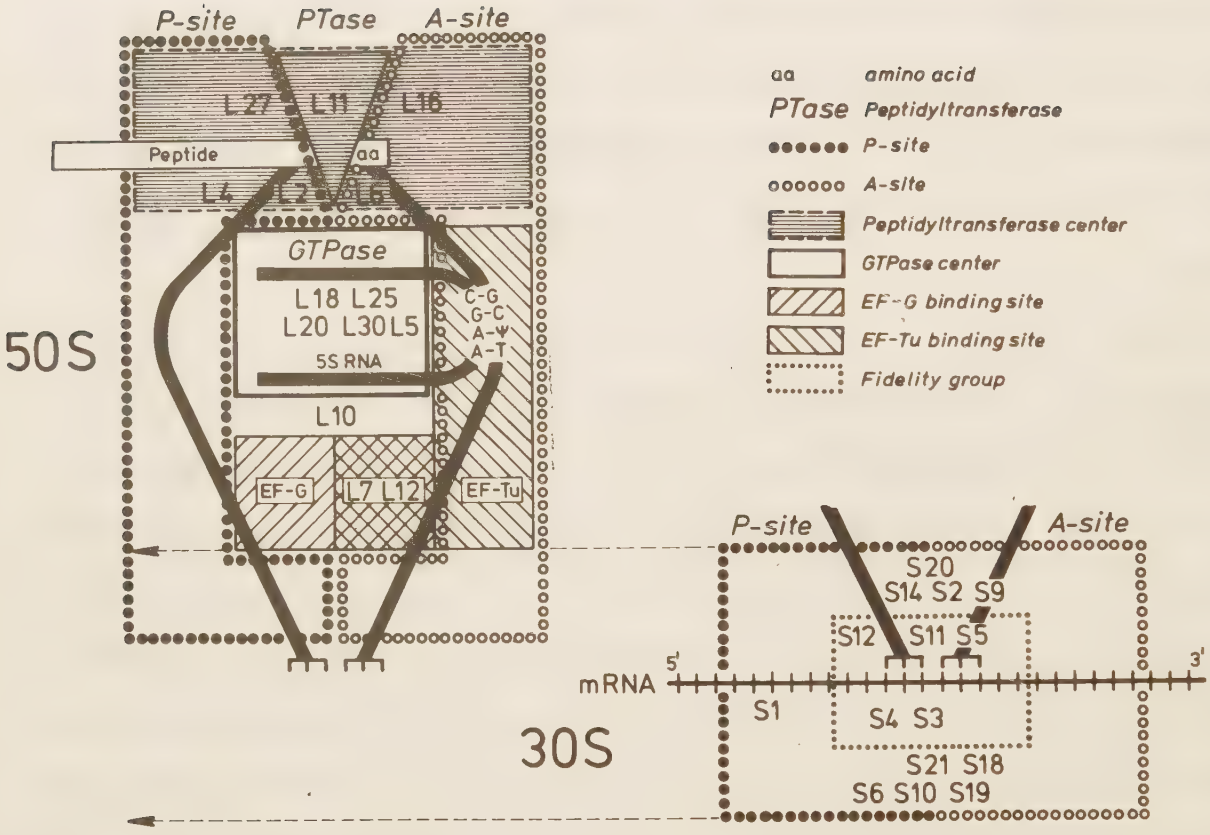


Abb. 3 Schematische Darstellung der Topographie funktionell wichtiger Proteine in der 50S - und 30S - Untereinheit von E. coli Ribosomen. Einzelheiten werden in der Arbeit von Pongs, Nierhaus, Erdmann & Wittmann (1974) wiedergegeben.

1.3. Affinitäts-Markierung

Diese Methode wurde bereits in mehreren Fällen erfolgreich zur Aufklärung von Enzym - Substrat - Wechselwirkungen (Cuatrecasas et al., 1969) sowie bei der Identifizierung aktiver Zentren des Ribosoms eingesetzt (Pongs et al., 1974; Pongs & Lanka, 1975; Pongs, Nierhaus et al.,1974; Cantor et al., 1974; Czernilofsky & Kuechler, 1972; Czernilofsky, Kollatz et al. 1974; Maassen & Möller, 1974; 1975;). Im wesentlichen handelt es sich hierbei um die Einführung einer chemisch reaktiven Gruppe in ein Substrat (z.B. aa-tRNS, mRNs oder Antibiotika), das bei der Bindung an sein Rezeptorprotein (oder in dessen unmittelbarer Nähe) eine kovalente Bindung eingeht. Ist die in das Substrat eingeführte reaktive Komponente radioaktiv markiert, so wird nach dessen Bindung der betreffende Rezeptor bzw. das Rezeptorareal radioaktiv markiert und läßt sich anschließend identifizieren. Die Spezifität der Reaktion muß durch Kompetitions- bzw. Funktionsanalysen jeweils überprüft werden. Das Ribosom kann als ein Komplex verschiedener Rezeptoren für eine Vielzahl von Substraten betrachtet werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Substanzen waren das α-Halo-Acetyl-Derivat von Puromycin und das α-Halo-Acetyl-Analogon von Chloramphenicol. Beide nicht modifizierten Antibiotika interferieren mit dem Peptidyltransferasezentrum und sind deshalb besonders gut zu dessen Strukturaufklärung geeignet.
Das 3' Ende einer jeden tRNS ist identisch und besteht aus den Nukleotiden C-C-A. Puromycin besitzt eine sehr große Ähnlichkeit mit dem Aminoacyl-Adenyl Ende einer aa-tRNS, wie aus Abb. 4a und b zu ersehen ist.

Puromycin kann wie eine aa-tRNS als Akzeptor einer wachsenden Polypeptidkette von einer "P - site" gebundenen Peptidyl - tRNS dienen. Es konkurriert daher mit der aa-tRNS um die Besetzung der ribosomalen "A - site" im Bereich der Peptidyltransferase. Sein Einbau in die wachsende Peptidkette bewirkt einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese und die Dissoziation unvollständiger Polypeptidketten vom Ribosom (Pestka, 1971).

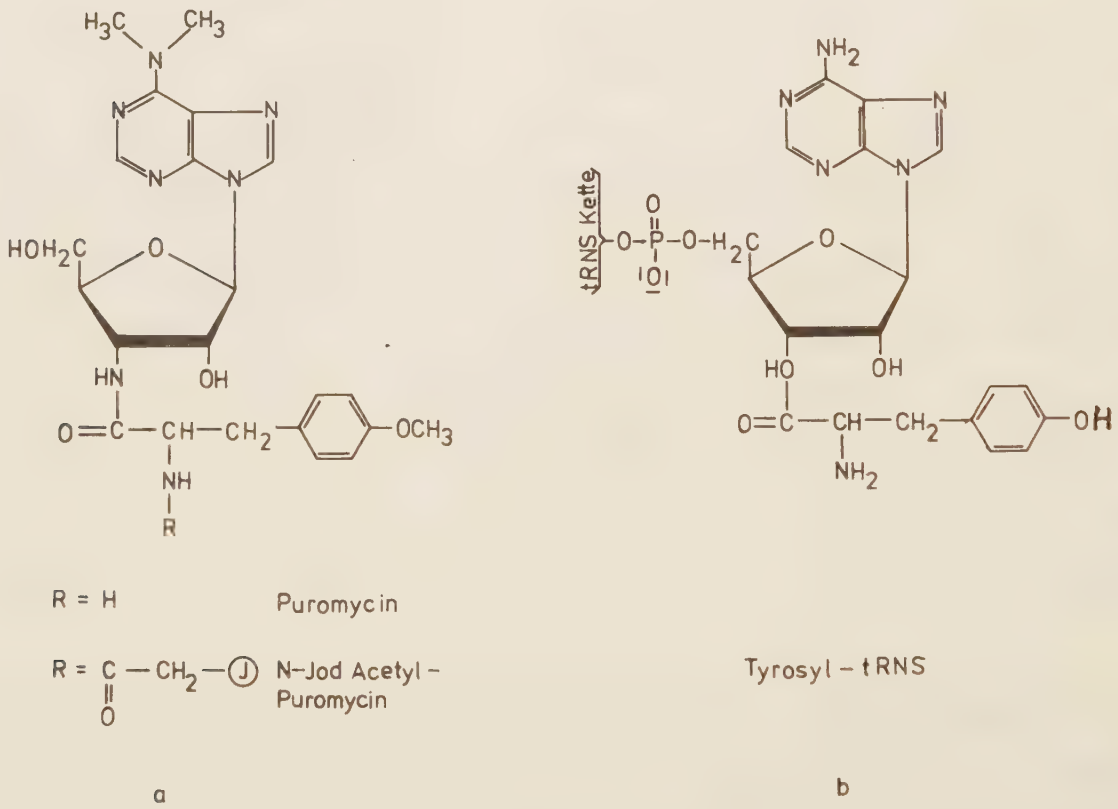


Abb. 4 Puromycin als Strukturanaloges des endständigen **Aminoacyl-adenosinanteils** einer Aminoacyl - tRNS (a,b).
N - Jodacetylpuromycin als Affinitäts - Markierungs Reagenz (a).

1.3. Affinitäts-Markierung

Diese Methode wurde bereits in mehreren Fällen erfolgreich zur Aufklärung von Enzym - Substrat - Wechselwirkungen (Cuatrecasas et al., 1969) sowie bei der Identifizierung aktiver Zentren des Ribosoms eingesetzt (Pongs et al., 1974; Pongs & Lanka, 1975; Pongs, Nierhaus et al.,1974; Cantor et al., 1974; Czernilofsky & Kuechler, 1972; Czernilofsky, Kollatz et al. 1974; Maassen & Möller, 1974; 1975;). Im wesentlichen handelt es sich hierbei um die Einführung einer chemisch reaktiven Gruppe in ein Substrat (z.B. aa-tRNS, mRNs oder Antibiotika), das bei der Bindung an sein Rezeptorprotein (oder in dessen unmittelbarer Nähe) eine kovalente Bindung eingeht. Ist die in das Substrat eingeführte reaktive Komponente radioaktiv markiert, so wird nach dessen Bindung der betreffende Rezeptor bzw. das Rezeptorareal radioaktiv markiert und läßt sich anschließend identifizieren. Die Spezifität der Reaktion muß durch Kompetitions- bzw. Funktionsanalysen jeweils überprüft werden. Das Ribosom kann als ein Komplex verschiedener Rezeptoren für eine Vielzahl von Substraten betrachtet werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Substanzen waren das α-Halo-Acetyl-Derivat von Puromycin und das α-Halo-Acetyl-Analogon von Chloramphenicol. Beide nicht modifizierten Antibiotika interferieren mit dem Peptidyltransferasezentrum und sind deshalb besonders gut zu dessen Strukturaufklärung geeignet.
Das 3' Ende einer jeden tRNS ist identisch und besteht aus den Nukleotiden C-C-A. Puromycin besitzt eine sehr große Ähnlichkeit mit dem Aminoacyl-Adenyl Ende einer aa-tRNS, wie aus Abb. 4a und b zu ersehen ist.

Puromycin kann wie eine aa-tRNS als Akzeptor einer wachsenden Polypeptidkette von einer "P - site" gebundenen Peptidyl - tRNS dienen. Es konkurriert daher mit der aa-tRNS um die Besetzung der ribosomalen "A - site" im Bereich der Peptidyltransferase. Sein Einbau in die wachsende Peptidkette bewirkt einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese und die Dissoziation unvollständiger Polypeptidketten vom Ribosom (Pestka, 1971).

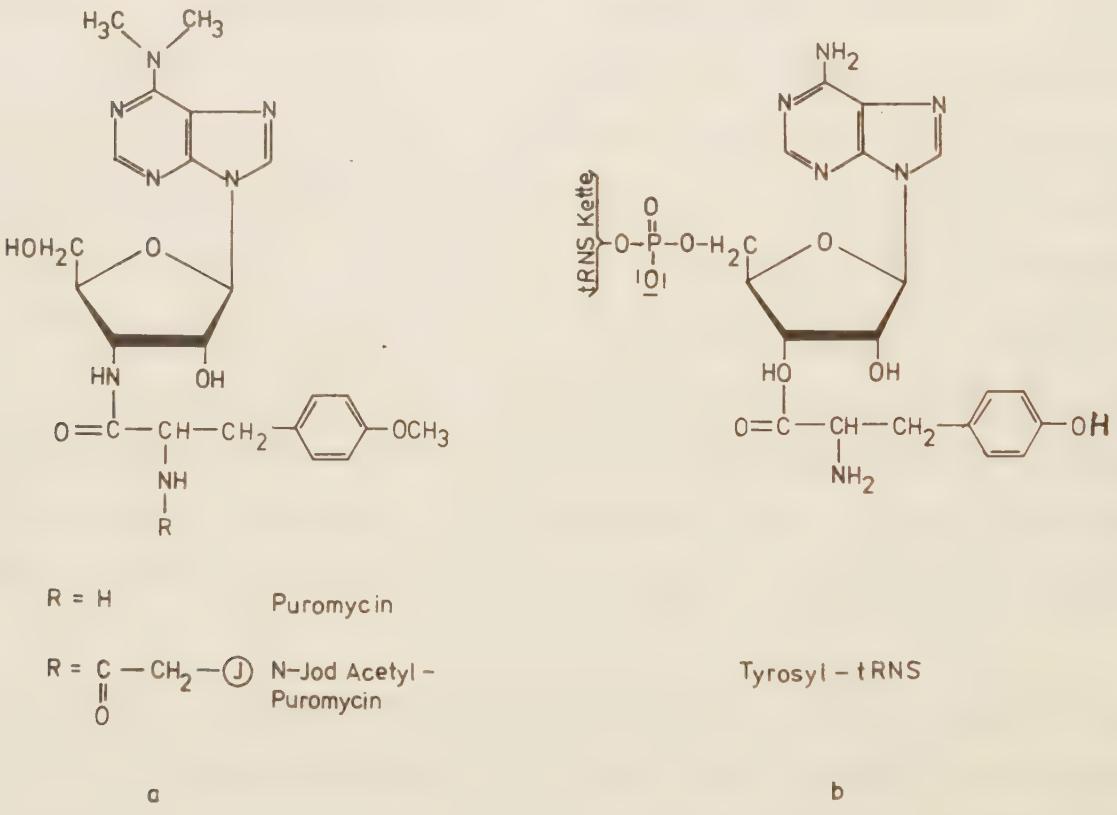


Abb. 4 Puromycin als Strukturanaloges des endständigen **Aminoacyl-adenosinanteils** einer Aminoacyl - tRNS (a,b).
N - Jodacetylpuromycin als Affinitäts - Markierungs Reagenz (a).

1.3. Affinitäts-Markierung

Diese Methode wurde bereits in mehreren Fällen erfolgreich zur Aufklärung von Enzym - Substrat - Wechselwirkungen (Cuatrecasas et al., 1969) sowie bei der Identifizierung aktiver Zentren des Ribosoms eingesetzt (Pongs et al., 1974; Pongs & Lanka, 1975; Pongs, Nierhaus et al.,1974; Cantor et al., 1974; Czernilofsky & Kuechler, 1972; Czernilofsky, Kollatz et al. 1974; Maassen & Möller, 1974; 1975;). Im wesentlichen handelt es sich hierbei um die Einführung einer chemisch reaktiven Gruppe in ein Substrat (z.B. aa-tRNS, mRNs oder Antibiotika), das bei der Bindung an sein Rezeptorprotein (oder in dessen unmittelbarer Nähe) eine kovalente Bindung eingeht. Ist die in das Substrat eingeführte reaktive Komponente radioaktiv markiert, so wird nach dessen Bindung der betreffende Rezeptor bzw. das Rezeptorareal radioaktiv markiert und läßt sich anschließend identifizieren. Die Spezifität der Reaktion muß durch Kompetitions- bzw. Funktionsanalysen jeweils überprüft werden. Das Ribosom kann als ein Komplex verschiedener Rezeptoren für eine Vielzahl von Substraten betrachtet werden.

Die in dieser Arbeit verwendete Substanzen waren das α-Halo-Acetyl-Derivat von Puromycin und das α-Halo-Acetyl-Analogon von Chloramphenicol. Beide nicht modifizierten Antibiotika interferieren mit dem Peptidyltransferasezentrum und sind deshalb besonders gut zu dessen Strukturaufklärung geeignet.
Das 3' Ende einer jeden tRNS ist identisch und besteht aus den Nukleotiden C-C-A. Puromycin besitzt eine sehr große Ähnlichkeit mit dem Aminoacyl-Adenyl Ende einer aa-tRNS, wie aus Abb. 4a und b zu ersehen ist.

Puromycin kann wie eine aa-tRNS als Akzeptor einer wachsenden Polypeptidkette von einer "P - site" gebundenen Peptidyl - tRNS dienen. Es konkurriert daher mit der aa-tRNS um die Besetzung der ribosomalen "A - site" im Bereich der Peptidyltransferase. Sein Einbau in die wachsende Peptidkette bewirkt einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese und die Dissoziation unvollständiger Polypeptidketten vom Ribosom (Pestka, 1971).

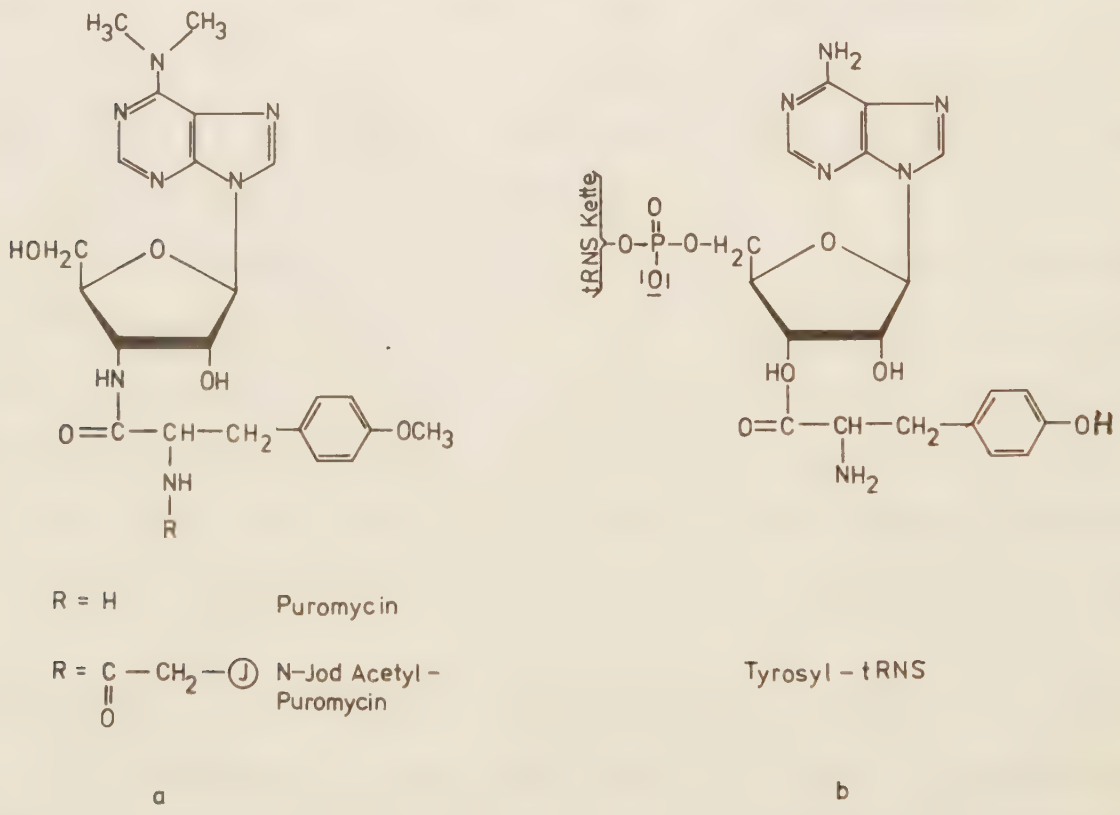


Abb. 4 Puromycin als Strukturanaloges des endständigen **Aminoacyl-adenosinanteils** einer Aminoacyl - tRNS (a,b).
N - Jodacetylpuromycin als Affinitäts - Markierungs Reagenz (a).

Chloramphenicol (CAM; s. Abb. 5) besitzt bakteriostatische Eigenschaften und hat auch heute noch in der Chemotherapie infektiöser Krankheiten große Bedeutung. Es ist ein Breitband - Antibiotikum, das das Wachstum gram - positiver wie gram - negativer Bakterien hemmt. Es interferiert spezifisch mit der 50S Untereinheit von Ribosomen, inhibiert hier die Bindung des Aminoacyl - Endes einer aa-tRNS und damit die Transpeptidierung durch die Peptidyltransferase.

1.4. Problemstellung

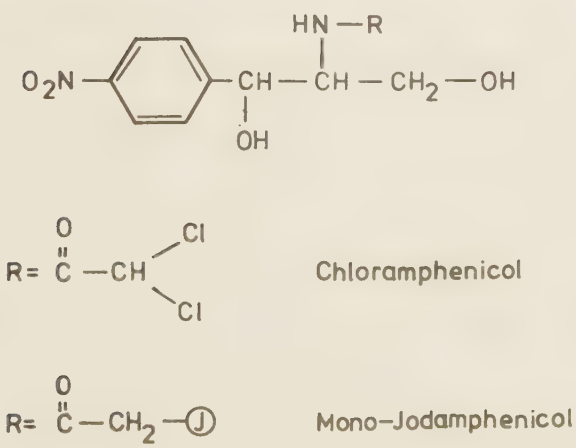


Abb. 5 Chloramphenicol und das Affinitäts - Markierungs Reagenz Monojodamphenicol.

Die in dieser Arbeit verwendeten modifizierten Analoga von Puromycin und Chloramphenicol waren N - Jodacetylpuromycin (JAcPuro), Abb. 4a und Monojodamphenicol (JAM), Abb. 5.
Aufgabe dieser Arbeit war es, die Reaktionsprodukte dieser radioaktiv markierten, modifizierten Antibiotika mit den Ribosomen

von B. stearothermophilus zu identifizieren. Es sollte gezeigt werden, daß die Analoga in ihrem spezifischen Zentrum, der Peptidyltransferase reagiert hatten. Ferner sollten die biologischen Funktionen der modifizierten Ribosomen untersucht werden. Außerdem waren die markierten Rezeptorproteine mit vorliegenden Ergebnissen an E. coli Ribosomen zu vergleichen, um Aufschluß über Konservierung bzw. Veränderung der Topographie des katalytischen Zentrums beider Bakterien-Spezies zu erhalten. Weiterhin sollte die Wirkung von CAM und JAM an intakten B. stearothermophilus Zellen untersucht und wenn möglich, der bzw. die Rezeptor(en) der in v i v o Markierung mit JAM charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Standard-Puffer, Lösungen, Materialien und Geräte

2.1.1. Standard-Puffer und Lösungen

TMA I : 10 mM Tris-HCL, pH 7.4 (23 ° C); 10 mM Magnesiumchlorid; 30 mM Ammoniumchlorid; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

TMA II : wie TMA I, jedoch Magnesiumchlorid 0.3 mM.

TMA III: 30 mM Tris HCL, pH 7.4 (23° C); 100 mM Magnesiumchlorid; 30 mM Ammoniumchlorid.

IP 1 - Puffer: 80 mM Ammoniumchlorid; 50 mM Tris HCL, ph 7.4 (23 ° C); 6 mM Magnesiumchlorid.

TMA - Waschpuffer: 20 mM Tris HCL, ph 7.4 (23 ° C); 30 mM Magnesiumchlorid, 1 M Ammoniumchlord; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

Puffer G/A: 0.1 M Tris HCL, pH 7.4 (23° C); 0.1 mM Magnesiumchlorid; 3 mM Ammoniumchlorid; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

SSC - Lösung: 3 M Natriumchlorid; 0.3 M Trinatriumcitrat.

Salin - Lösung: 9g/1 Natriumchlorid; 1.42 ml/1 35%ige (g/g) Formaldehydlösung.

Nähragar: 10.0 g Trypton, 5.0 g Hefe, 15.0 Natriumchlorid, 5.0 g Glucose und 15.0 Agar pro Liter.

Puffer und Fließmittel für die Synthesen

KAc Puffer: 0.2 M Kaliumacetat, pH 6, in 5o% Methanol

Puffer Equ.: 2 M Triäthylammoniumbicarbonat, pH 7.5

Fließmittel I: Chloroform/Methanol 9 : 1

Fließmittel II: Chloroform/Methanol 9.5 : 0.5

Lösungen für die Herstellung von Sarkosyl - Gelen

Lösung 1 : 30.0 g Acrylamid, 2.5 g N,N' - Diallyltartardiamid pro 100 ml Lösung.

Lösung 2 : 10.0 g N - Lauroyl - Sarkosin (Na-Salz) pro 100 ml Lösung auf pH 8.0 eingestellt mit NaOH.

Lösung 3 : 50 ml der Lösung 2; 25 ml 1M Tris-Phosphorsäure - Puffer, pH 7.8; 1.5 ml N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin pro 100 ml Lösung.

Lösung 4 : 1.0 g $(NH_4)_2 S_2 O_8$ pro 100 ml Lösung.

Lösung 5 : Elektrophorese-Puffer: 5 mM Tris-Phosphorsäure, pH 7.8; 0.5% N - Lauroyl - Sarkosin (Na - Salz);
175 ml der Lösung 2;
17.5 ml eines 1 M Tris-Phosphorsäure-Puffers, pH 7.8,
pro 3.5 l Lösung.

Lösungen für die Herstellung von Sarkosyl - Gradienten - Gelen

Lösung 1_G : 25 mM Tris Phosphorsäure, pH 7.8; 0.5% N - Lauroyl Sarkosin; 0.15% N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin; 0.02 % $(NH_4)_2 S_2O_8$.

Lösung 2_G : 17.5% Acrylamid und 1.45% N,N' - Diallyltartardiamid.

Lösung 3_G : 23% Acrylamid und 1.9% N,N' - Diallyltartardiamid.

Lösung 4_G : Elektrophorese Puffer: 5 mM Tris-Phosphorsäure, pH 7.8; 0,5% N - Lauroyl - Sarkosin (Na-Salz).

Szintillationsflüssigkeiten

Bray's Lösung: 0.48 M Naphthalin; 0.018 M PPO (2,5 - Diphenyloxazol); 0.62 mM POPOP (1,4 - bis 2 - (5-Phenyloxazolyl) - Benzol); 10% Methanol; 2% Äthylenglykol in Dioxan.

Toluol - Triton Lösung : 67 Vol.-% Toluol, 33 Vol.-% Triton X - 100 und 5.0 g PPO pro Liter.

Toluol - PPO - POPOP - Lösung : 2.8 g PPO und 0.9 g POPOP pro Liter Toluol.

2.1.2. Materialien

Radioaktiv markierte Substanzen von d. Fa. "The Radiochemical Centre", Amersham, England :

Jod - [2-^{14}C] - essigsäure 22 - 52 mCi/ mmol

Jod - [1-^{14}C] - acetamid 60 mCi/ mmol

DL - Phenyl - [1-^{14}C] alanin 40 - 60 mCi/ mmol

[γ - ^{32}P] ATP und [γ - ^{32}P] GTP 1- 5 Ci/ mol

L - 4,5 - [^{3}H] - Leucin 57 Ci/mmol

6 - [^{3}H] Thymin 20 - 30 Ci/ mmol

Substanzen, die von Mitarbeitern d. Max Planck Institutes für Molekulare Genetik, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden:

Monojodamphenicol (nicht radioaktiv markiert) von Herrn Dr. R. Bald

S - 100 Enzymfraktion von E. coli von Herrn S. Lorenz

f2 - Phagen RNS von Herrn S. Lorenz und Frau S. Isono

C-A-C-C-A - [^{3}H] - LeuAc und C-A-C-C-A - [^{3}H] - Leu von Herrn Dr. K.H. Nierhaus

Elongationsfaktor EF-G von Herrn K. Paehlke

Chemikalien von d. Fa. Serva, Heidelberg :

Puromycin aus Streptomyces albo - niger

Dowex - Ionenaustauscher (Type 1 x 2, mesh 50 - 100, Gegenion = Cl)

N - Lauroyl - Sarkosin (Na-Salz)

Coomassie Brillant-Blau R - 250

Triton X - 100, n : 10

Chemikalien von der Fa. Boehringer, Mannheim :

Chloramphenicol,

Polyuridylsäure (lyophilisiertes Kaliumsalz) 2.2 uMol/mg

ATP und GTP

Chemikalien von d. Fa. Merck, Darmstadt :

TLC - Platten (Aluminiumoxid, F_{254}, neutral)

Amidoschwarz 10 B sowie alle übrigen Standardchemikalien

DE 23 - Anionenaustauscher, Whatman

D - (-) - threo 1-p-nitrophenyl -2- amino - 1,3 propandiol (Chloramphenicolbase) Sigma, St. Louis, USA

N,N' - Diallyltartardiamid, EGA - Chemie KG, Steinheim, Albuch

N,N,N',N' - Tetramethyläthylendiamin, Fluka AG, Buchs, Schweiz

Insta Gel, Packard, Zürich

PPO und POPOP, Packard Instruments Co. Inc. Warrenville, Illionois, USA

Aktivkohle, Norit

Millipore Filter, HA 0,45 u, 25 mm, weiß, glatt, Millipre SA, Buc, Frankreich

Glasfilterpapier, Ø 23 mm, Nr. 6, Schleicher - Schüll

2.1.3. Geräte

Zentrifugen

Padberg Schnell - Zentrifuge

Sorvall Superspeed RC 2 - B

Beckmann Spinco L2 - 65 K

MSE Superspeed 65

Szintillationszähler

Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 544

Photometer

Lange Labor Photometer

Spektralphotometer Zeiss PMQ II

2.2. Synthesen

2.2.1. Synthese von N - Jod - [2 - ^{14}C] - acetylpuromycin

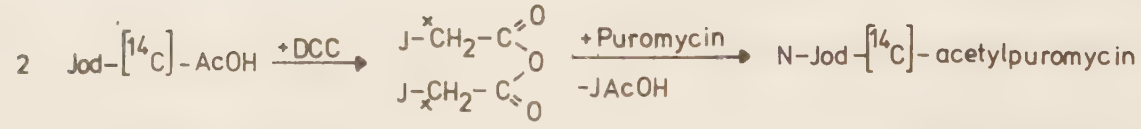


Abb. 6 Syntheseschema für N - Jodacetylpuromycin.
Einzelheiten sind im Text wiedergegeben.

Die Synthese von N - Jodacetylpuromycin folgte in etwas veränderter Form den von Pongs et al. beschriebenen Syntheseschritten (Abb. 6; Pongs, Bald & Erdmann, 1973 a). Danach wurden 20 uMol Jod - [2 - ^{14}C] - essigsäure (51 mCi/ mMol) in 100 µl wasserfreiem Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 20 µMol N,N' Dicyclohexylcarbodiimid in 100 µl wasserfreiem Dioxan umgesetzt. Nach zweistündiger Reaktionszeit (Raumtemperatur) wurde der ausgefallene N,N' - Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert, mit 100 µl wasserfreiem Dioxan nachgewaschen und nochmals zentrifugiert. Die vereinigten Überstände enthielten Jodessigsäureanhydrid, das einer Lösung von 10 µMol Puromycin in 0.2 M Kaliumacetat - Puffer zugegeben wurde. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden lang bei + 4° C (Kühlschrank) inkubiert. Danach wurde es auf eine zuvor mit Puffer Equ.equilibrierte DEAE - Anionenaustauscher - Säule (1.5 x 5 cm) aufgetragen, um die bei der Umsetzung von Puromycin mit Jodessigsäureanhydrid freigewordene Jodessigsäure aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Die Säule wurde mit etwa 10 ml 50% (v/v) Methanol nachgewaschen und das Eluat in Fraktionen von ca. 1 ml gesammelt. Fraktionen 2 - 7 enthielten den Hauptanteil der gesuchten Verbindung, die anschließend unter Vakuum

am Rotationsverdampfer bei 20° C bis zur Trockne eingeengt wurde. Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol aufgenommen.

UV - Spektrum λ_{Max} : 275 nm

λ_{Min} : 242 nm

R_f auf TLC - Aluminium Dünnschichtplatten in Fließmittel II : 0,84;
Relative Mobilität gegenüber Puromycin : 1.5
Aufbewahrung bei - 170° C (flüssiger Stickstoff).

2.2.2. Synthese von Monojod [^{14}C] amphenicol

Die Synthese von Monojod [^{14}C] amphenicol folgte im wesentlichen dem von Rebstock (1950) und Bald, Erdmann & Pongs (1972) beschriebenen Verfahren (Abb. 7). Im Ansatz wurden 60 µMol Jod [2 - ^{14}C] essigsäure (51mCi/mMol) verwendet und mit 60 µMol N,N' dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 65 µMol N - hydroxisuccinimid (NHS) in 300 µl wasserfreiem Dioxan umgesetzt, wobei N,N' dicyclohexylharnstoff sofort ausfiel.

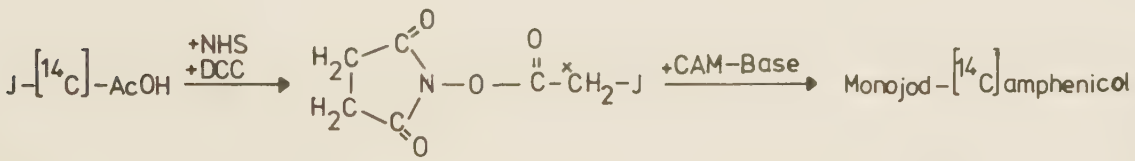


Abb. 7 Syntheseschema für Monojodamphenicol.
Einzelheiten sind im Text wiedergegeben.

Nach einer Stunde Reaktionszeit (Raumtemperatur) wurde der Harnstoff abzentrifugiert, der Überstand daraufhin zu einer Lösung von 60 µMol D - (-) - threo - 1 - p - nitrophenyl - 2 - amino - 1,3 propandiol (Chloramphenicolbase) in 0.6 ml Dioxan/ 0.1 M Phosphat

Puffer, pH 7 (1:1) gegeben und 2 h bei + 4° C (Kühlschrank) stehengelassen. Dieses Reaktionsgemisch wurde anschließend auf eine Dowex - Ionenaustauscher - Säule (1.5 x 10 cm) aufgetragen, mit ca. 90 ml H_2O eluiert und das Eluat in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Fraktionen 17 - 52 enthielten den Hauptanteil der gesuchten Verbindung, der bis auf ein Volumen von ca. 5 ml unter Vakuum am Rotationsverdampfer bei 25° C eingeengt wurde.

UV - Spektrum λ_{Max} : 276 nm

λ_{Min} : 240 nm

R_f auf TLC - Aluminium Dünnschichtplatten in Fließmittel I : 0.5.
Aufbewahrung erfolgte bei - 80° C.

2.3. Anzucht von Bacillus stearothermophilus Stamm 799

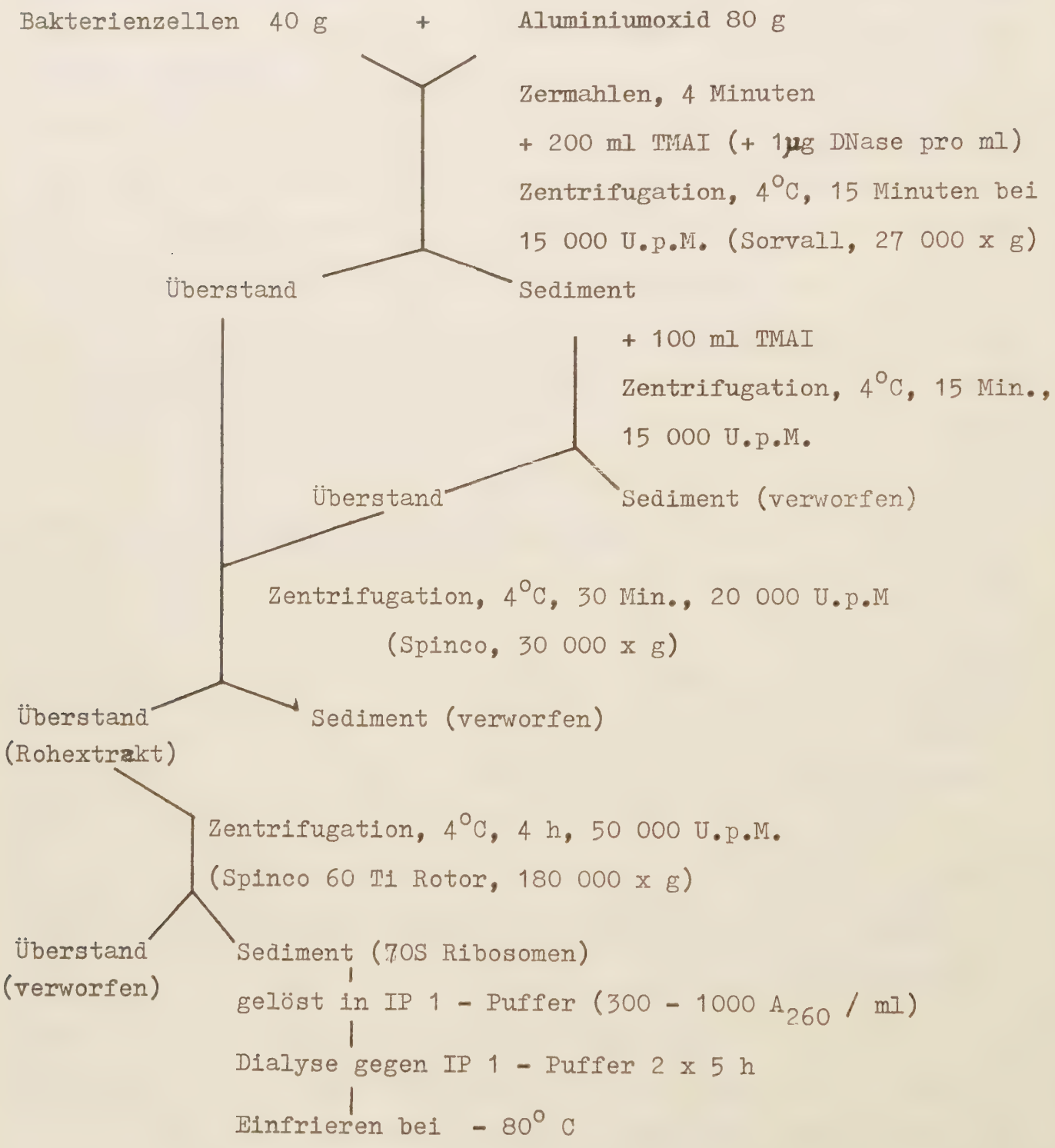
Nährmedium: 10.0 g Trypton, 5.0 g Hefeextrakt, 10.0 g Natriumchlorid, 10.0 g Glucose, 0.1 mg Manganchlorid alle Angaben pro Liter. B.stearothermophilus 799 wurde im Institut für Gärungsforschung der Technischen Universität Berlin, in einem New Brunswick 100 l Fermenter bei 61° C gezüchtet. 100 l steriles Medium wurden mit 3 l Vorkultur angeimpft.
Das Wachstum der Zellen wurde bei 650 mμ optisch verfolgt. Wenn die Zellkultur eine Absorption von 0.5 - 0.6 erreicht hatte, wurde das Nährmedium mit Eis auf 4 - 10° C gekühlt. Die gekühlten Bakterien wurden in einer Padberg - Schnellzentrifuge bei 20 000 U.p.M. abzentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden dann ausgewogen und bei - 80° C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Die Durchschnittausbeute pro 10 l Medium betrug 26 g Zellen. Unter optimalen Bedingungen hat B. stearothermophilus 799 bei 61° C eine Generationszeit von 12 - 18 Minuten.

2.4. Präparation von Ribosomen

2.4.1. 70S Ribosomen

Die eingefrorenen Bakterien wurden mit der doppelten Menge Aluminiumoxid (Alcoa) in einem Porzellan-Mörser zerrieben bis eine homogene Paste entstand. Diese wurde 4 Minuten lang kräftig verrührt, bis der größte Teil der Zellen aufgebrochen war. Die so aufgebrochenen Zellen und das Aluminiumoxid wurden in TMA I Puffer (mit 1 µg DNase pro ml, Ribonuklease frei) suspendiert und für 15 Minuten bei 4° C und 15 000 U.p.M. zentrifugiert (Sorvall). Der Überstand wurde auf Eis gestellt und das Sediment (Zellen, Zellwände und Aluminiumoxid) noch einmal in TMA I suspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der zweite Überstand mit dem ersten vereinigt und in einer Spinco-Zentrifuge (Rotor Nr. 30) bei 20.000 U.p.M. und 4° C für 30 Minuten zentrifugiert. Der letzte Überstand stellt den Rohextrakt dar. Die 70S Ribosomen wurden aus dem rohen Zellextrakt durch Ultrazentrifugation (Spinco, Rotor 60 Ti, 50 000 U.p.M., 4° C, 4 Stunden) isoliert. Die im Sediment befindlichen 70S Ribosomen wurden in IP 1 - Puffer gelöst (300 - 1000 A_{260} pro ml). Das aus dem TMA I - Puffer stammende 2-Mercaptoäthanol, das als Rest noch in der 70S Ribosomenlösung vorhanden war, wurde durch zweimalige Dialyse über 5 Stunden gegen je 5 Liter IP 1 - Puffer aus der Lösung entfernt. In Abb. 8 ist die Aufarbeitung der 70S Ribosomen aus B. stearothermophilus schematisch dargestellt.

Abb. 8 Aufarbeitung von B. stearothermophilus 70S Ribosomen



2.4.2. Waschen von 70S Ribosomen

70S B. stearothermophilus (mehr als 160 A_{260}/ ml) wurden 12 Stunden lang bei 4° C in TMA - Waschpuffer langsam gerührt. Die so behandelten Ribosomen wurden anschließend abzentrifugiert (5 h, 45 000 U.p.M., Spinco, 50 Ti Rotor). Um Proteine, die sich während des Waschens von den Ribosomen lösen, zu identifizieren, wurde der Überstand 3 mal 8 Stunden lang gegen je 5 Liter 2%ige Essigsäure dialysiert und anschließend lyophilisiert, so daß die Proteine damit für die zweidimensionale Elektrophorese vorbereitet waren.

2.4.3. Präparation von 50S-und 30S Untereinheiten

Das im Folgenden beschriebene Verfahren (Zonalzentrifugation) zur Trennung der 50S- und 30S Untereinheiten wurde für nicht modifizierte und für die chemisch modifizierten 70S Ribosomen angewendet.
70S Ribosomen wurden durch Dialyse (4° C, 8 Stunden) gegen TMA II - Puffer in ihre 50S - und 30S Untereinheiten dissoziiert und danach durch Zonalzentrifugation nach Eikenberry et al. (1970) voneinander getrennt. Der hierfür benutzte Sucrosegradient enthielt 6 bis 38% Saccharose in TMA II - Puffer. Typische Trennungen sind in Abb. 14 und 15 wiedergegeben.
Die in der Zonalzentrifugation aufgetrennten 30S und 50S Untereinheiten wurden durch Präzipitation mit Hilfe von Polyäthylenglykol 6000 (PEG 6000) nach Expert - Bezançon et al. (1974) eingeengt. Pro 100 ml der Sucroselösung wurden 1 ml 1 M $MgCl_2$ - Lösung und portionsweise 10 g PEG 6000 unter Umrühren auf Eis dazugegeben. Nachdem das PEG 6000 gelöst war, ließ man die Ribosomenlösungen noch 30 Minuten bei 0° C rühren. Aus der entstandenen Ribosomensuspension

wurden die ribosomalen Untereinheiten für 30 - bis 45 Minuten bei 12 000 U.p.M. abzentrifugiert (Sorvall). Das Sediment wurde in TMAI - Puffer (100 - 500 A_{260} pro ml) resuspendiert und gegen zweimal 5 Liter TMAI - Puffer (4° C, 8 h) dialysiert. Die so gewonnenen ribosomalen Untereinheiten wurden bei - 80° C eingefroren und konnten für die Elektrophoresen und biologischen Funktionsteste weiter verwendet werden.
Die Überstandsfranktionen der Zonalläufe von chemisch modifizierten 70S Ribosomen wurden 4 Tage lang gegen 2%ige Essigsäure dialysiert, die etwa alle 12 Stunden erneuert wurde. Die dialysierte Lösung wurde anschließend lyophilisiert und bis zur Analyse durch die zweidimensionale Elektrophorese (s.u.) aufgehoben.

2.5. Inkubation von 70S Ribosomen mit N - Jod [2 - ^{14}C] - acetyl-puromycin und Monojod [^{14}C] amphenicol

Es wurden die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionen bei konstanter Inkubationszeit sowie der zeitliche Verlauf der Reaktionen von 70S B. stearothermophilus Ribosomen mit den betreffenden Affinitäts - Markierungs-Reagenzien untersucht. Dabei wurden 70S Ribosomen eingesetzt, die nach ihrer Isolierung für 10 Minuten bei 50° C mit einem 300fachen Überschuß an Puromycin (gelöst in Methanol) vorinkubiert worden waren. Der Methanolanteil am Gesamtvolumen der Inkubationslösung betrug 10 %. Zur Kontrolle wurde ein anderer Teil der 70S Ribosomen mit derselben Menge Methanol behandelt. Nach dieser Vorinkubation wurden die Ribosomen in einer Spinco Zentrifuge (Rotor 50 Ti) 6 Stunden lang bei 4° C und 45 000 U.p.M. zentrifugiert. Das Ribosomensediment wurde anschließend wieder in IP 1 - Puffer gelöst (ca. 800 A_{260} pro ml).
Die Versuchsdaten der Kinetik und der Konzentrationsabhängigkeit

wurden dann wie folgt ermittelt:

Kinetik

Ribosomen wurden in IP 1 - Puffer bei 50° C mit dem jeweiligen Reagenz inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden dem Reaktionsgemisch aliquote Teile (25 µl) entnommen, auf 0°C in Eis gekühlt und mit 4 ml 5%iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Das Präzipitat wurde auf Schleicher - Schüll Glasfiber-Filter filtriert und dreimal mit 4 ml Portionen kalter 5%iger TCA gewaschen. Die Filter wurden dann unter einer Infrarotlampe 1/2 Stunde lang getrocknet. Die Radioaktivität, die auf den Filtern verblieben war, wurde im Szintillationszähler nach Zugabe von Toluol - PPO - Szintillations-Flüssigkeit (5 ml pro Probe) gemessen.

Konzentrationsabhängigkeit

Steigende Ribosomenkonzentrationen (2 - 25 µM) wurden mit einer konstanten Menge des jeweiligen Reagenzes (15 µM) in IP 1 - Puffer bei 50° C zwei Stunden lang inkubiert. Aliquote Teile wurden anschließend wie bei der Ermittelung der Reaktionskinetik mit TCA gefällt, filtriert, und die Radioaktivität wurde bestimmt.

2.6. Auftrennung und Charakterisierung ribosomaler Proteine

2.6.1. Proteinextraktion aus Ribosomen

Die ribosomalen Proteine wurden nach der von Hardy et al. (1969) beschriebenen Methode (Essigsäure - Extraktion) isoliert. Die Lösungen der 30S- und 50S Untereinheiten wurden durch Zugabe einer 1 M Magnesiumchloridlösung auf 0.1 M $MgCl_2$ gebracht. Unter starkem Rühren im Eisbad wurden dann zwei Volumina Eisessig langsam hinzugegeben und

die entstehende Suspension (Ausfall von ribosomaler RNS) eine Stunde lang gerührt. Die ausgefallene ribosomale RNS wurde anschließend abzentrifugiert (10 Minuten, 10 000 U.p.M. und 4° C, Sorvall) und der Überstand erst gegen 20%ige Essigsäure, dann gegen 5%ige Essigsäure für jeweils 6 Stunden und schließlich über Nacht gegen 2%ige Essigsäure dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauchs wurde dann gefriergetrocknet. Damit waren die extrahierten Proteine für die Elektrophorese - Charakterisierung bereit.

2.6.2. Elektrophorese ribosomaler Proteine in Polyacrylamid - N - Lauroyl - Sarkosin Gelen

Die Auftrennung ribosomaler Proteine in einer Polyacrylamid - N - Lauroyl - Sarkosin (Sarkosyl) - Gel Elektrophorese erfolgte nach der von Brimacombe et al. beschriebenen Methode (1971). Das Trägermaterial ist ein perjodatlösliches 15%iges Polyacrylamid - Gel (Anker, 1970), das mit dem Detergens Sarkosyl versetzt ist. Sarkosyl belädt die Oberfläche der zu trennenden Proteine, die bei pH 7.8 weitgehend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde aus den Gelen das N - Lauroyl - Sarkosin (Na-Salz) mit 25%iger TCA, die in 50%igem Methanol gelöst war herausgewaschen. Das stark geschrumpfte Gel wurde anschließend mit 50%iger wässriger TCA behandelt und danach mit 0.1%iger Coomassiee Brillant - Blau Lösung in 50%iger TCA für 10 Stunden gefärbt. Entfärbt wurde das Gel in zwei Schritten : 1. mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Essigsäure (5 : 4 : 1) und 2. mit 10%iger wässriger Essigsäure. Nachdem das Gel fotografiert war, wurden die einzelnen Proben, soweit sie radioaktiv markiert waren, als Streifen aus dem Gel herausgeschnitten und in Schnitte von 2.5 mm Breite zerteilt. Nach Auflösen mit 1 ml 2%iger Perjodsäure pro Schnitt in Szintillationsgläs-

chen wurden 10 ml Toluol - Triton Szintillations-Flüssigkeit pro Gläschen hinzugefügt. Es wurde auf 4° C gekühlt und in einem Szintillationszähler die Radioaktivität gemessen.

2.6.3. Elektrophorese ribosomaler Proteine in Polyacrylamid - N - Lauroyl - Sarkosin Gradienten Gelen

Ein etwas abgeändertes Trenn - Gel für die eben beschriebene Elektrophorese ist ein Sarkosyl - Gradienten Gel, wie es von Möller & Brimacombe (1975) beschrieben wurde. Dabei wurde der Gel - Gradient aus einer 17,5%igen - und 23%igen Acrylamidlösung durch Mischen in einem Gradientenformer gebildet. Die Elektrophorese wurde ca. 20 Stunden bei 300 Volt durchgeführt. Färbung und Auswertung entsprachen dem im vorausgegangenem Abschnitt beschriebenen Verfahren.
Das Gradienten Gel hat gegenüber dem "normalen" Sarkosyl - Gel den Vorteil, daß es eine schärfere Trennung der Proteinbanden ermöglicht.

2.6.4. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gel Elektrophorese von ribosomalen Proteinen

Die Identifizierung ribosomaler Proteine erfolgte mit Hilfe der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann (1970). 100 äquivaltente Einheiten = ä.E. (1 ä.E. = diejenige Menge an ribosomalen Proteinen, die sich mit Hilfe der Essigsäureextraktion aus 1 A_{260} Einheit Ribosomen gewinnen läßt) wurden pro Gel aufgetragen. In der ersten Dimension werden die Proteine bei pH 8.6 in einem 8%igen Acrylamidgel vornehmlich auf Grund ihrer Nettoladung getrennt, während in der zweiten Dimension bei pH 4.6 und 18%igem Acrylamid vorzugsweise die Molekülgröße die

Trennung bestimmt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gelplatten mit Amidoschwarz angefärbt (0.5 % Amidoschwarz, 5 % Essigsäure, 5 Minuten). Die Platten wurden unter mehrfachen Auswechseln des Entfärbebades in 10%iger Essigsäure entfärbt. Nach der Entfärbung der Gele wurden diese fotografiert und anschließend jeder Proteinfleck und dessen unmittelbare Umgebung mit einem Korkbohrer (Ø = 0.5 cm) ausgestochen. Die ausgestochenen Gelstückchen wurden in festverschlossenen Szintillationsgläschen mit je 10 ml Insta-Gel bei 60° C über Nacht aufgelöst, danach auf 4° C abgekühlt und im Szintillationszähler gemessen.

2.7. Methoden zur Bestimmung der biologischen Funktion ribosomaler Partikel

Für alle im Folgenden beschriebenen Funktionsteste wurden jeweils Doppelansätze pro Probe durchgeführt und aus den Ergebnissen nach Abzug der Blindwerte die Durchschnittswerte berechnet.

2.7.1. Polyuridylsäure - abhängige Polyphenylalanin Synthese Poly (U) - System

Die zellfreie Synthese von Peptiden an natürlichen und synthetischen Polyribonukleotiden wurde von Nirenberg & Matthaei (1961) entwickelt. Sie wurde in dieser Arbeit im wesentlichen nach der von Traub (1971) modifizierten Methode durchgeführt. Hierbei wurden sog. "Hybrid - Ribosomen" aus 50S *B. stearothermophilus* - und 30S *E. coli* Untereinheiten getestet, weil sich die kleine ribosomale Untereinheit von *E. coli* in diesen und anderen Funktionsversuchen als stabiler erwiesen hatte als die 30S Untereinheit von *B. stearothermophilus*.
Das Reaktionsgemisch enthielt folgende Bestandteile pro Probe:
1.5 A_{260} 50S *B. stearothermophilus* Ribosomen (modifiziert und nicht-

modifiziert als Kontrolle), 1.0 A_{260} 30S E.coli Ribosomen, S 100 (eine Zellfraktion, die aus löslichen Enzymen besteht), Polyuridylsäure (Poly - U), E. coli tRNS-Gemisch, 5' - Triphosphate von Adenosin und Guanosin, [^{14}C] - Phenylalanin, dessen Einbau in mit TCA präzipitierbares Material als Indikator für die ribosomale Syntheseleistung diente, und schließlich anorganische Salze. Das Endvolumen pro Probe betrug 200 µl. Die Reaktionsmischung wurde ohne Vorinkubation 30 Minuten lang bei 37° C inkubiert, danach ins Eisbad gestellt und mit 2 ml 5%iger TCA versetzt. Um noch vorhandene [^{14}C] - Phe - $tRNS^{Phe}$ zu hydrolysieren, wurde das Gemisch 15 Minuten lang auf 90° C erhitzt und dann wieder auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde über Schleicher Schüll Glasfiber - Filter filtriert, mit dreimal 2 ml kalter 5%iger TCA nachgewaschen und die Filter unter einer Infrarotlampe 30 Minuten lang getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Toluol - PPO - POPOP pro Probe wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

2.7.2. Proteinsynthese im natürlichen f2 - Phagen RNS System

Als Matrize für die zellfreie Synthese von Peptiden (Protein) diente in diesem System die RNS des E.coli Phagen f2. Das System ist zum Bestimmen der Translationsfähigkeit von Ribosomen gegenüber dem künstlichen Poly-(U) System sensitiver, weil die Übersetzung der f2 RNS in das entsprechende Peptid das exakte Erkennen des Initiationscodons AUG und die genaue Abfolge der Initiation durch die Ribosomen voraussetzt. Die Methode ist ebenfalls von Traub et al. (1971) beschrieben worden und wurde insofern nur geringfügig abgeändert, als Valin 20% der erforderlichen spezifischen Radioaktivität besaß und das Aminosäuren-Gemisch nur 4 µMol pro ml von jeder Aminosäure enthielt. Auch hier wurden sog. "Hybrid - Ribosomen" getestet.

Pro Probe waren in der Inkubationslösung 1.5 A_{260} 50S von B. stearothermophilus - und 1.0 A_{260} 30S von E.coli Ribosomen enthalten. Die Inkubationsbedingungen und die Auswertung dieser Versuche waren ähnlich denen des Poly-(U)-Systems.

2.7.3. Bestimmung der Peptidyltransferaseaktivität mit Hilfe der "Fragment - Reaktion"

Die enzymatische Aktivität der Peptidyltransferase läßt sich bestimmen nach der von Monro et al. beschriebenen Methode (Monro et al. 1968; Monro, 1971). Die wesentlichen Bestandteile in diesem Versuch sind das Fragment eines 3' - Endes einer Peptidyl - tRNS, nämlich C-A-C-C-A - Leu-Ac, Puromycin und die 50S ribosomale Untereinheit (Abb. 9). Folgende Reaktion wird dabei durch die Peptidyltransferase auf der 50S Untereinheit katalysiert und gemessen:

CACCA - [^{3}H] LeuAc + Puromycin ⟶ Ac- [^{3}H] Leu - Puromycin + CACCA

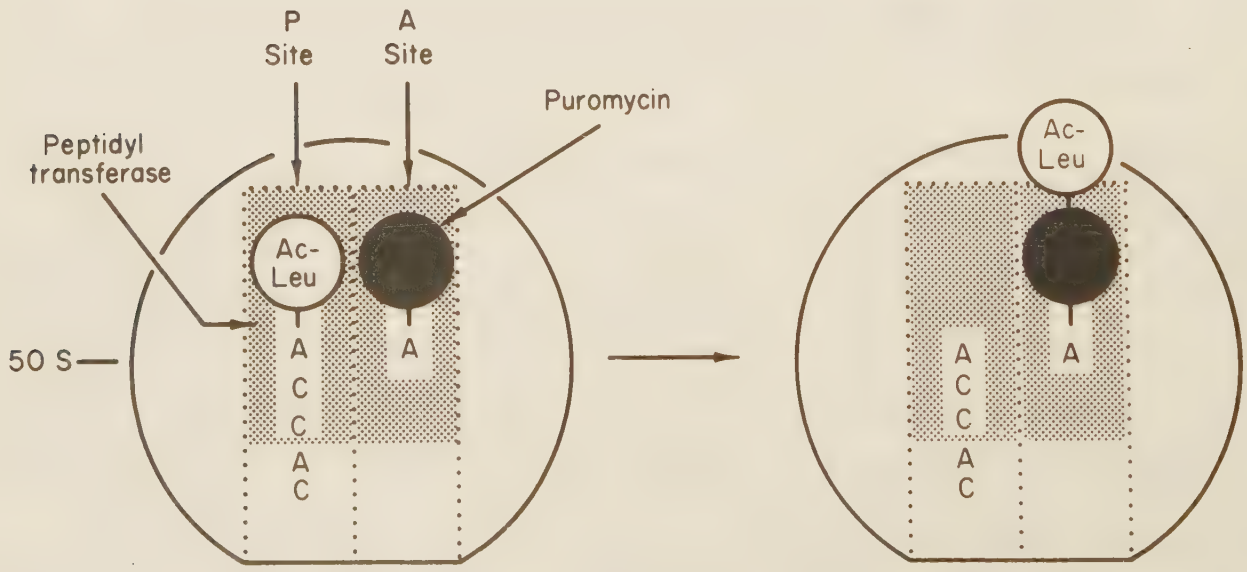


Abb. 9 Reaktionsschema der "Fragment - Reaktion". Aus Monro (1971)

Die Reaktionszeit betrug 45 Minuten bei 0° C. Das Reaktionsprodukt Ac-[^{3}H] Leu - Puromycin wurde nach Zugabe von 0.3 M Natriumacetat-Puffer, pH 5.5, der mit Magnesiumsulfat gesättigt war, mit 1,5 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde 1 ml Extrakt mit 5 ml Insta - Gel vermischt und im Szintillationszähler gemessen.

2.7.4. Bindung der tRNS 3' - End Fragmente C-A-C-C-A[^{3}H] Leu und C-A-C-C-A[^{3}H] LeuAc

Um zeigen zu können, welche der Bindungsstellen ("A - " bzw. "P - site") am Peptidyltransferasezentrum möglicherweise durch chemische Modifikation mit einem der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien blockiert war, wurde in einer Gleichgewichtsdialyse die Bindung des "A-site" spezifischen Fragments C-A-C-C-A-[^{3}H]-Leu und des "P-site" spezifischen Fragments C-A-C-C-A-[^{3}H]-LeuAc an 50S Untereinheiten gemessen. Die Gleichgewichtsdialyse wurde bei - 2° C in 50 µl Kammern nach Nierhaus & Ulbrich (in Vorbereitung) durchgeführt.

2.7.5. Bestimmung der ATP - und GTP - Hydrolyseaktivität

Die in diesen Versuchen angewandte Methode ist im wesentlichen von Parmeggiani et al. (1971) beschrieben worden. Eingesetzt wurden 1.5 A_{260} 50S Untereinheiten pro Probe. In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurde in Gegenwart von Puffer G/A und 0.12 mM[γ - ^{32}P] -GTP mit und ohne Elongationsfaktor G die GTP - Hydrolyse für 30 Minuten bei 45° C und pH 7.4 bestimmt. Die Bedingungen für die Bestimmung der ATP-Hydrolyse in demselben Volumen und in Gegenwart von Puffer G/A und 0.12 mM[γ - ^{32}P] ATP waren 30 Minuten bei 60° C und pH 7.8 (Horne & Erdmann, 1973). Nach der Inkubation wurden die Proben auf

Eis gesetzt, je 100 µl 1 M Ameisensäure hinzugegeben und schließlich 500 µl einer 6%igen Aktivkohle (Norit, HCL gewaschen)-Suspension dazugegeben, um nichtumgesetztes GTP bzw. ATP zu binden. Anschließend wurde dreimal je 1 Minute lang mit Unterbrechung von je 10 Minuten auf einem Vortex-Mischer stark vermischt. Dann wurden die Proben in einer Tischzentrifuge (3000 u.p.M., 15 Minuten) zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 500 µl entnommen, in Zählröhrchen mit 5 ml Bray's Szintillations-Flüssigkeit versetzt und die Radioaktivität bestimmt.

2.8. In v i v o Reaktion von Monojodamphenicol mit B. stearothermophilus 799

Alle im Folgenden erwähnten Funktionsteste wurden mit nicht-radioaktiv markierten JAM durchgeführt. Lediglich die Versuche zur Markierung und Charakterisierung ribosomaler Proteine wurden mit radioaktivem Reagenz durchgeführt.

2.8.1. Anzucht von B. stearothermophilus 799 für die in v i v o Markierung mit Monojodamphenicol und Wachstumskontrollen

Das verwendete Nährmedium ist unter 2.3. beschrieben worden. Angesetzt wurden Schüttelkulturen von 20 ml bei 61° C, die bei einer Zelldichte von 7×10^7 Zellen/ml (entspr. ca. 0.055 A_{560}) mit jeweils 85 µg/ml CAM bzw. 100 µg/ml JAM versetzt wurden. Das Wachstum der Zellen wurde optisch verfolgt bei 560 nm in einem Lange Labor-Photometer. Die Änderung der Zellzahl während des Wachstums wurde in einer 1:100 Verdünnung (100 µl Aliquote aus der Kultur wurden mit 10 ml Kochsalz-Lösung versetzt) bestimmt mit Hilfe eines "Coulter 30 µ Counters", der mit einem "Nuclear Data Multichannel Analyzer" verbunden war.

Die Zahl der lebenden Zellen wurde bestimmt, indem in regelmäßigen Zeitabständen der Zellkultur 100 µl Aliquote entnommen wurden, diese in SSC-Puffer um den Faktor 10^{-5} verdünnt wurden und von dieser Verdünnung 100 µl auf sterilem Nähragar in Petrischalen ausplattiert wurde. Nach ca. 12-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 60° C konnte die Anzahl der Zellkolonien bestimmt werden.

2.8.2. Protein- und DNS - Syntheseraten bei B. stearothermophilus unter Einfluß von Chloroamphenicol und Monojodamphenicol

Die Proteinsyntheserate wurde durch Einbau von [^{3}H] - Leucin (0.14 mCi pro 20 ml Vollmedium) in mit TCA präzipitierbares Material gemessen. Dabei wurden zu bestimmten Zeiten jeder Kultur 0.5 ml entnommen, mit 5 ml eisgekühlter 5%iger TCA versetzt und über Millipore - Filter filtriert. Jede Probe wurde dreimal mit je 5 ml 5%iger TCA und einmal mit 1 ml Äthanol nachgewaschen. Die Filter kamen in Szintillationsgläschen und wurden bei 50° C unter Vakuum im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde nach Zugabe von 5 ml Toluol - PPO - POPOP Szintillations-Flüssigkeit die Radioaktivität gemessen.

Der Einbau von [^{3}H] Thymin in bakterielle DNS wurde in ähnlicher Weise bestimmt. Hier wurden jedoch "5 Minuten Pulse" gemessen, indem bei 60° C zu je 0.5 ml Vollmedium mit je 1,25 µCi [^{3}H] Thymin (20-30 Ci/m Mol) 0.5 ml einer Bakterienkultur zugegeben wurde. Diese Proben wurden jeweils 5 Minuten lang inkubiert und anschließend mit 4 ml gekühlter 5%iger TCA präzipitiert und filtriert.

2.8.3. Inkubation von B. stearothermophilus 799 mit Monojod [^{14}C] amphenicol

Eine in 100 ml Vollmedium bei 60° C exponentiell wachsende Kultur von

B. stearothermophilus wurde bei einer Zelldichte von 7 x 10^7 Zellen / ml in vier Proben (A-D) zu je 20 ml aufgeteilt. Zu Probe A wurden 100 µg/ml-, zu B 10 µg/ml-, zu C ebenfalls 10 µg/ml [^{14}C] JAM und zu Probe D 85 µg/ml CAM gegeben. Die so angeimpften Kulturen ließ man bei 60° C weiterwachsen. Zur letzten Probe wurden nach 30 Minuten Vorinkubation noch einmal 100 µg/ml [^{14}C] JAM hinzugegeben und für weitere 90 Minuten inkubiert. Probe A wurde insgesamt 90 Minuten bis zum Stillstand des Wachstums bei einer Zelldichte von ca. 1.2 x 10^8 Zellen/ml (entspr. ca. 0.1 A_{560}) inkubiert. Bis zu der gleichen Zelldichte wurde auch Probe B inkubiert. Probe C wurde zwei Stunden lang inkubiert, bis sie eine Zelldichte von etwa 9 x 10^8 Zellen/ml erreicht hatte. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 20 ml TMA I und Abkühlen der Inkubationslösungen auf 0° C abgebrochen. Die Zellen wurden unmittelbar danach durch Zentrifugation (12 000 U.p.M., 30 Minuten, Sorvall) geerntet, anschließend einmal mit je 10 ml TMA I gewaschen, erneut abzentrifugiert und schließlich in 10 ml TMA III - Puffer aufgenommen.

2.8.4. Proteinextraktion aus in v i v o markierten B. stearothermophilus Kulturen

Die Proteine wurden ähnlich der von Hardy et al. (1969) beschriebenen Methoden aus den Zellen extrahiert. Die in je 10 ml TMA III suspendierten Zellen der Proben A - D wurden im Eisbad unter starkem Rühren mit dem doppelten Volumen Eisessig unter portionsweiser Zugabe versetzt. Nach zwei Stunden Rühren bei 0° C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (20 Minuten, 12 000 U.p.M., 4° C, Sorvall) beseitigt. Der Überstand wurde stufenweise gegen 60%-, 20%-, 5%- und 2%ige Essigsäure für jeweils 6 - 10 Stunden dialysiert und schließlich lyophilisiert. Die so erhaltenen Proteine wurden mit Hilfe der Sarkosyl - Gradienten Gel Elektrophorese weiter analysiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Reaktion von 70S Ribosomen mit N - Jod - [2 - ^{14}C] -acetyl-puromycin

Abb. 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reaktion von JAcPuro mit 70S Ribosomen von B. stearothermophilus, die 10 Minuten lang mit 3 mM Puromycin (gelöst in Methanol) und solchen 70S Ribosomen, die 10 Minuten lang mit derselben Menge Methanol vorinkubiert wurden. Der Methanolanteil am Gesamtvolumen der Inkubationslösung betrug 10 %. Die Konzentrationen an Ribosomen und Reagenz in der Inkubationslösung waren 2.3 µM 70S Ribosomen und 20 µM JAcPuro. Die Reaktionszeit betrug zwei Stunden bei 50° C. Ungefähr zwei Mole Reagenz pro Mol 70S Ribosom waren nach zwei Stunden gebunden worden. Durch Vorinkubation mit Puromycin wurde die Reaktion deutlich stimuliert, was als ein erster Hinweis dafür betrachtet werden kann, daß das Reagenz in der Nähe des Peptidyltransferasezentrums gebunden wurde (s.u.).

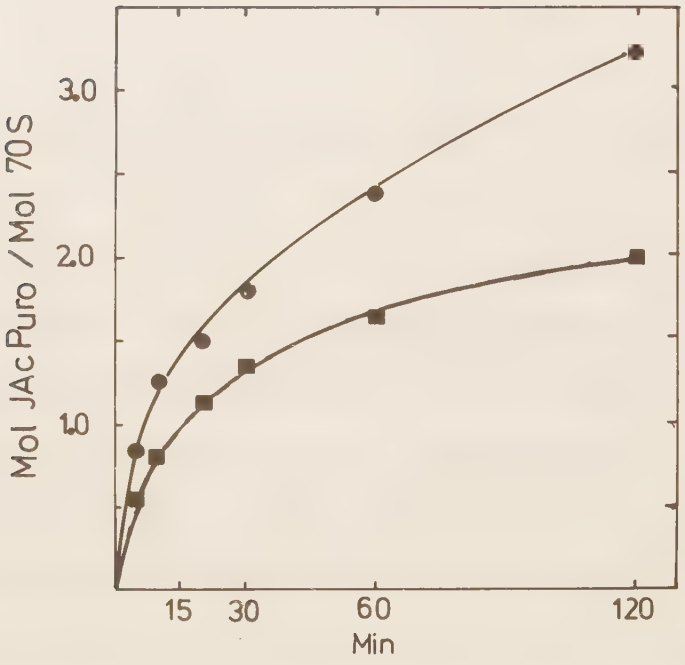


Abb. 10 Reaktionskinetik von JAcPuro mit 70S Ribosomen von B. stearothermophilus. Inkubationsbedingungen sind im Text beschrieben. 70S Ribosomen, die mit Puromycin (●——●) und 70S Ribosomen, die mit Methanol vorinkubiert wurden (■——■).

Die Abhängigkeit der Affinitäts - Markierung von der Konzentration der 70S Ribosomen wurde gemessen, um Aussagen über die Stöchiometrie der Reaktion zu erhalten (Abb. 11). Dabei wurden bei konstanter JAcPuro - Konzentration (15 µM) verschiedene Konzentrationen (2 - 25 µM) an 70S Ribosomen, die, wie unter Abschnitt 2.5. beschrieben, präpariert wurden, zwei Stunden lang bei 50° C inkubiert.

Wie Abb. 11 zeigt, hatten bei äquimolarer Konzentration die Ribosomen, die mit Methanol gewaschen waren etwa 20 % (entspr. 0.2 Mol JAcPuro / Mol 70S Ribosomen) des angebotenen Reagenzes gebunden, während die mit Puromycin zuvor gewaschenen Ribosomen mit etwa 30 % JAcPuro reagiert hatten (entspr. 0.3 Mol JAcPuro / Mol 70S Ribosomen).

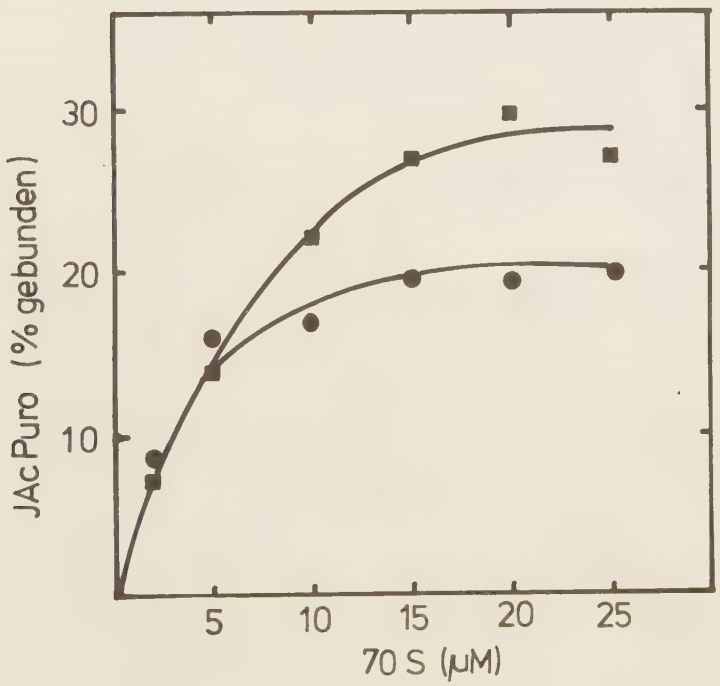


Abb. 11 Konzentrationsabhängigkeit der JAcPuro - 70S Ribosomen - Reaktion. 70S Ribosomen mit Puromycin (■——■) bzw. mit Methanol gewaschen (●——●); s. Abschn. 2.5. Reaktionsbedingungen sind im Text beschrieben.

3.2. Reaktion von 70S Ribosomen mit Monojod [^{14}C] amphenicol

Die Reaktionskinetik von 70S Ribosomen mit Monojod [^{14}C] amphenicol ist in Abb. 12 wiedergegeben. Auch hier wurden die Ribosomen zuvor mit 3 mM Puromycin bzw. Methanol jeweils 10 Minuten lang vorinkubiert. Der Methanolanteil war 10 % in den Inkubationslösungen. Die molaren Konzentrationen betrugen: Ribosomen 6.8 µM und [^{14}C] JAM 60 µM. Nach einer Stunde Reaktionszeit hatte nur etwa 0.1 Mol des Reagenzes pro Mol 70S gebunden. Wir fanden ebenfalls eine Stimulierung der Reaktion, wenn die Ribosomen mit Puromycin vorinkubiert wurden.

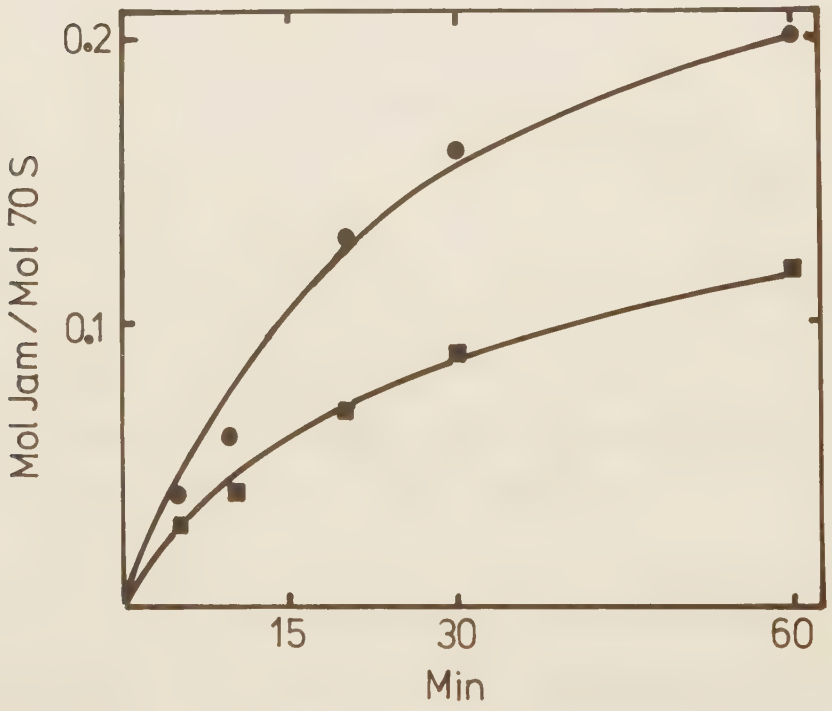


Abb. 12 Reaktionskinetik von Monojod [^{14}C] amphenicol mit 70S Ribosomen, die mit Methanol (■——■) und Ribosomen, die mit Puromycin vorinkubiert wurden (●——●). Reaktionsbedingungen im Text.

Die Abhängigkeit der Monojod [^{14}C] amphenicol Reaktion von der Konzentration an 70S Ribosomen wurde unter denselben Bedingungen gemessen, wie im vorhergehenden Abschnitt angegeben. Bei äquimolarer Konzentration hatten hier etwa 30 % (entspr. 0.3 Mol JAM / Mol 70S Ribosomen) des angebotenen [^{14}C] JAM reagiert, während Puromycin gewaschene Ribosomen unter diesen Bedingungen bis zu ca. 38 % des Reagenzes gebunden hatten (entspr. 0.38 Mol JAM/Mol 70S Ribosomen).

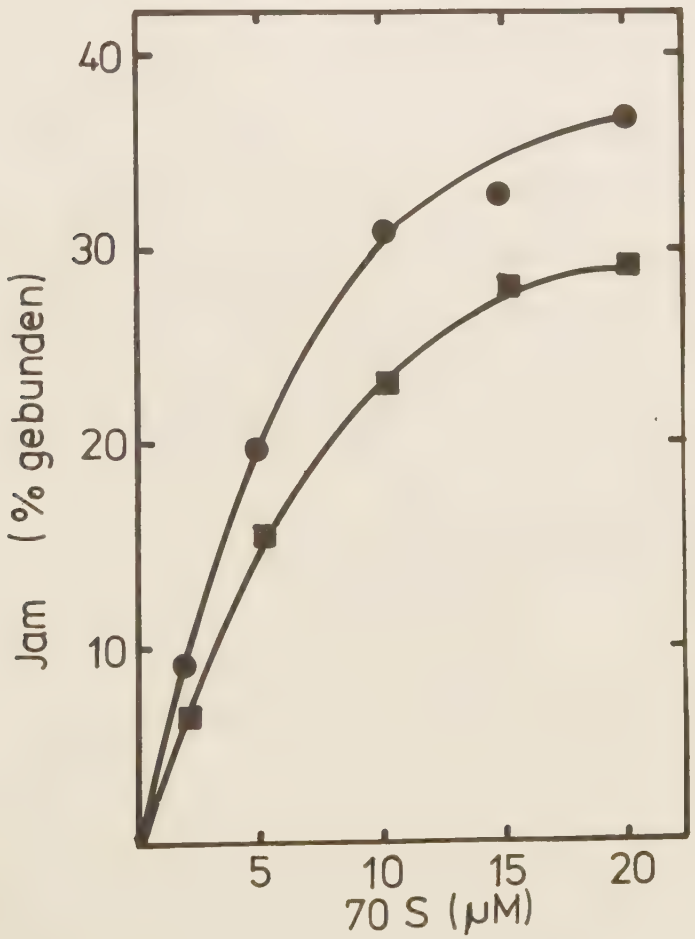


Abb. 13 Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion von Monojod [^{14}C] amphenicol mit 70S Ribosomen (■——■) und Ribosomen, die mit Puromycin gewaschen waren (●——●). Reaktionsbedingungen im Text.

3.3. Gradientenanalyse von modifizierten 70S Ribosomen

Je 1200 A_{260} 70S Ribosomen (7.5 µM) wurden zwei Stunden lang bei 50° C mit dem 10 fachen - und 100 fachen Überschuß an [^{14}C] JAcPuro und [^{14}C] JAM inkubiert. Da diese Reagenzien formell auch als Derivate des -SH-Gruppen Reagenzes Jodacetatmid betrachtet werden können, wurden zusätzlich zu denselben Bedingungen je 1200 A_{260} 70S Ribosomen mit [^{14}C] Jodacetamid als eine der Kontrollen für die Funktionsteste und die Proteinmarkierung inkubiert. Die Reaktion mit den Reagenzien wurde durch Zugabe von 20 ml TMA II - Puffer und Abkühlen des Reaktionsgemisches auf 0° C abgebrochen. Die durch Zugabe von TMA II dissoziierten 50S und 30S Untereinheiten wurden anschließend durch Zonalzentrifugation voneinander getrennt. Abbildungen 14 und 15 zeigen die betreffenden Gradientenprofile, aus denen ersichtlich ist, daß beide ribosomale Unterheiten des jeweilige Reagenz gebunden hatten. Ein analoges Profil ergaben die mit [^{14}C] $JAcNH_2$ markierten Ribosomen.

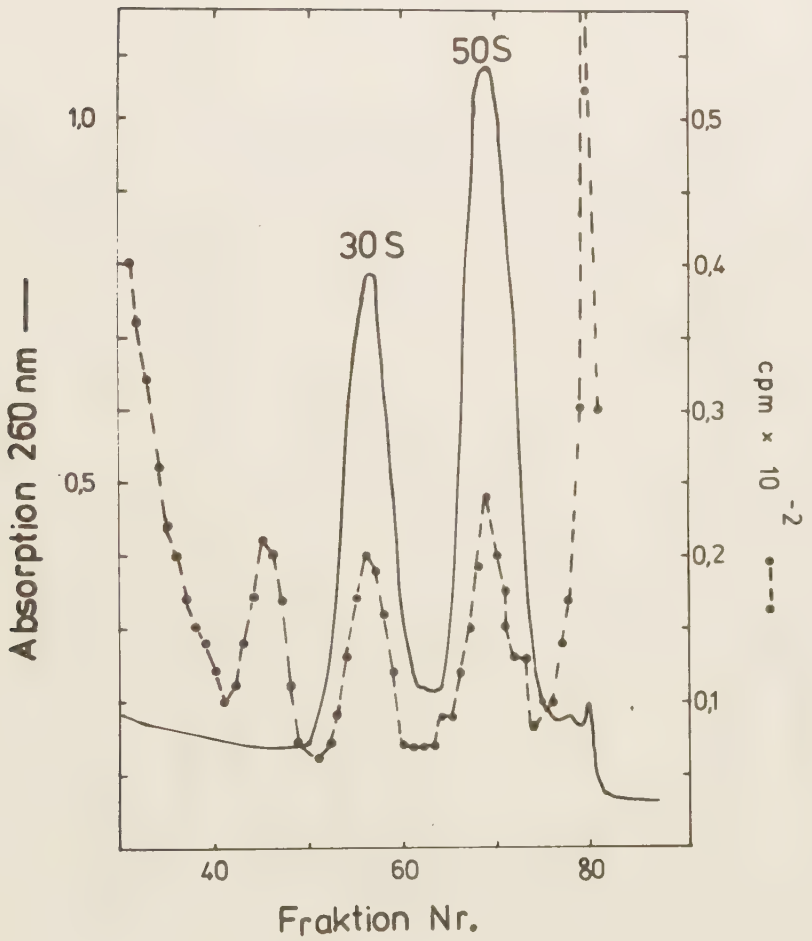


Abb. 14 Gradientenprofil der mit [^{14}C] JAcPuro in 10 fachem Überschuß inkubierten Ribosomen.

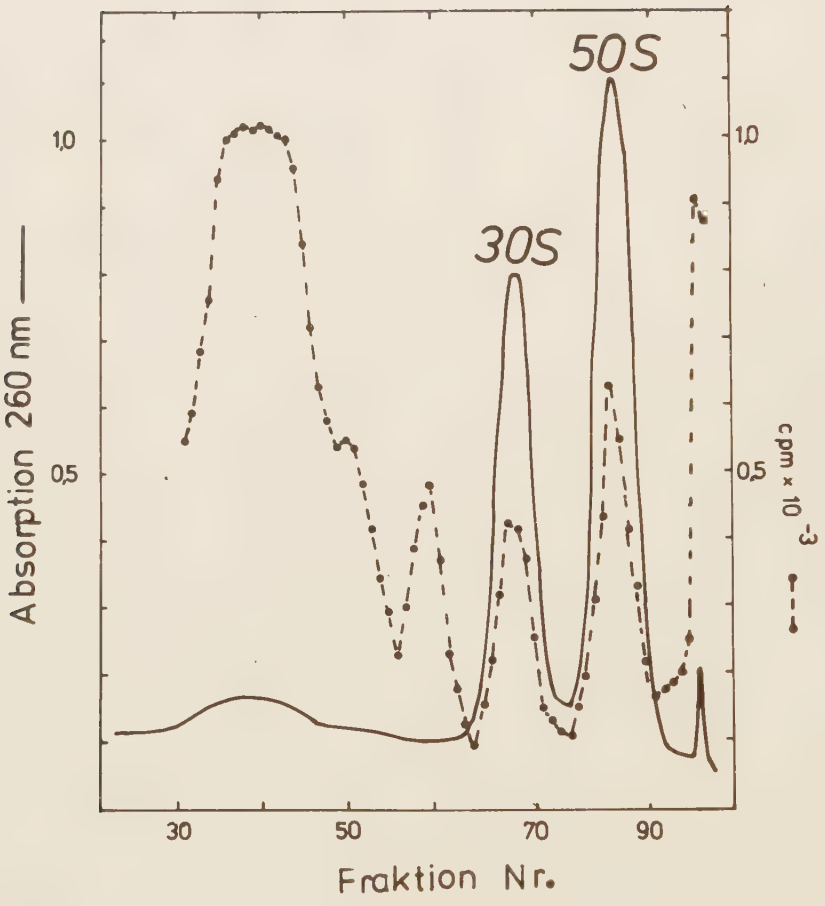


Abb. 15 Gradientenprofil der mit [^{14}C] JAM in 100 fachem Überschuß inkubierten Ribosomen.

Nach der Isolierung der Untereinheiten durch Polyäthylenlykolfällung wurden die Modifikationsraten bestimmt, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Überschuß an Reagenz in der Inkubationslösung	ribosomale Untereinheit	cpm/ A_{260}	Modifikationsrate in %	Mol Reagenz/ Mol ribos. Untereinheit
10 x JAcPuro	50S	624	20	0.20
	30S	1063	20	0.20
100 x JAcPuro	50S	6281	200	2.0
	30S	8850	167	1.67
10 x $JAcNH_2$	50S	1284	27	0.27
	30S	1821	22	0.22
100 x $JAcNH_2$	50S	10667	226	2.26
	30S	13562	167	1.67
10 x JAM	50S	388	27	0.27
	30S	396	20	0.20
100 x JAM	50S	990	92	0.92
	30S	2450	130	1.30

Tab. 1 Modifikationsraten ribosomaler Untereinheiten nach Inkubation von 70S Ribosomen in 10- und 100 fachem Überschuß der bezeichneten Reagenzien. 100% bedeuten, daß 1 Mol Reagenz pro Mol ribosomaler Untereinheit reagiert hatten.

3.4. Elektrophoretische Analyse von modifizierten ribosomalen - und Überstand-Proteinen

Bei allen Affinitäts-Markierungs-Versuchen ist ein Hauptproblem der Nachweis der Spezifität der Bindung des chemisch modifizierten Substrates an seinen Rezeptor. Da die von uns verwendeten Reagenzien auch als Jodacetamid-Derivate betrachtet werden können und als solche auch nukleophile Gruppen an unspezifischen Rezeptoren alkylieren, galt es die folgenden Fragen zu klären: Welche ribosomalen Porteine werden modifiziert? Ändert sich deren Zahl und die Präferenz mit steigender Modifikationsrate? Läßt es sich trennen zwischen solchen Proteinen, die die Reagenzien in einer spezifischen bzw. unspezifischen Reaktion binden?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden die chemisch modifizierten ribosomalen Proteine elektrophoretisch auf einem 15%igen Sarkosyl-Gel und in der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gel Elektrophorese analysiert. Die $E_r$gebnisse der Sarkosyl-Gel Analyse von 70S Proteinen, die mit [^{14}C] JAcPuro markiert worden waren, sind in Abb. 16 zusammengefaßt. Im wesentlichen ließen sich dabei sechs radioaktiv markierte Hauptbanden feststellen, die in beiden Proben auftraten (Abb. 16,1 und 1'), sich allerdings mit steigender Modifikationsrate in ihrem Verhältnis zueinander veränderten.

Abb. 17 zeigt die Ergebnisse, die mit dieser Methode bei Proteinen aus 50S Untereinheiten erzielt wurden, die nach der Reaktion mit [^{14}C] JAM durch die beschriebene Zonalzentrifugation aus 70S Ribosomen isoliert worden waren. Während bei Probe 2' zehn radioaktive Hauptbanden auftraten (Abb. 17 a - j), ließen sich bei Probe 2 allerdings nur vier breite Banden feststellen (Abb. 17, a, b, i, j), die mit erhöhter Modifikationsrate auch entsprechend mehr Radioaktivität

enthielten.

Die Zuordnung der radioaktiven Banden zu bestimmten ribosomalen Proteinen ist nach dieser Analyse auf Sarkosyl-Gelen noch nicht möglich, da bisher die Zuordnung der 50S Proteinbanden in der Sarkosyl-Gel Elektrophorese nur für E. coli Ribosomen durchgeführt wurden (Newton & Brimacombe, 1974).

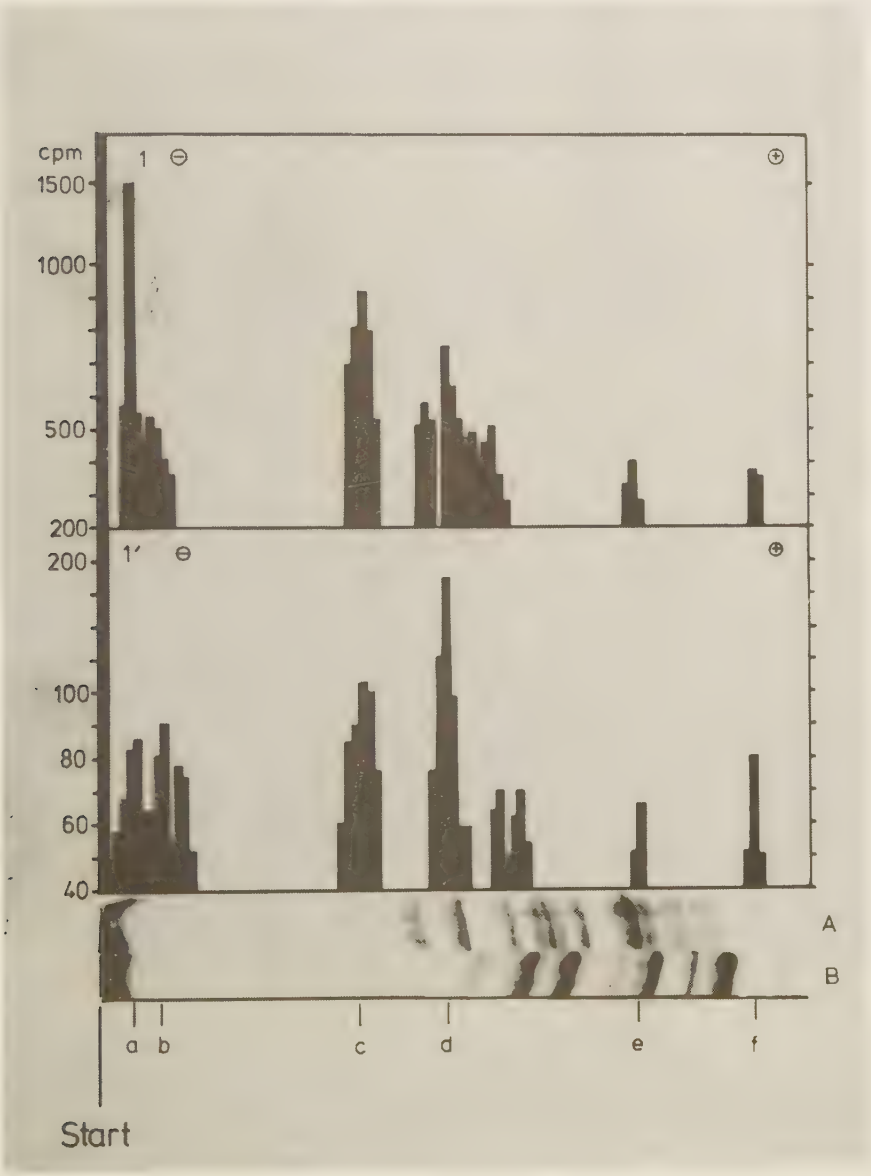


Abb. 16 Sarkosyl-Gel Elektrophorese von 70S Ribosomen, die mit [^{14}C] JAcPuro im 10 fachen-(1') und im 100 fachen-(1) Überschuß inkubiert worden waren. A: 50S Proteine und B: 30S Proteine von B. stearothermophilus, die als Kontrollen in diesem Versuch mit analysiert worden waren.

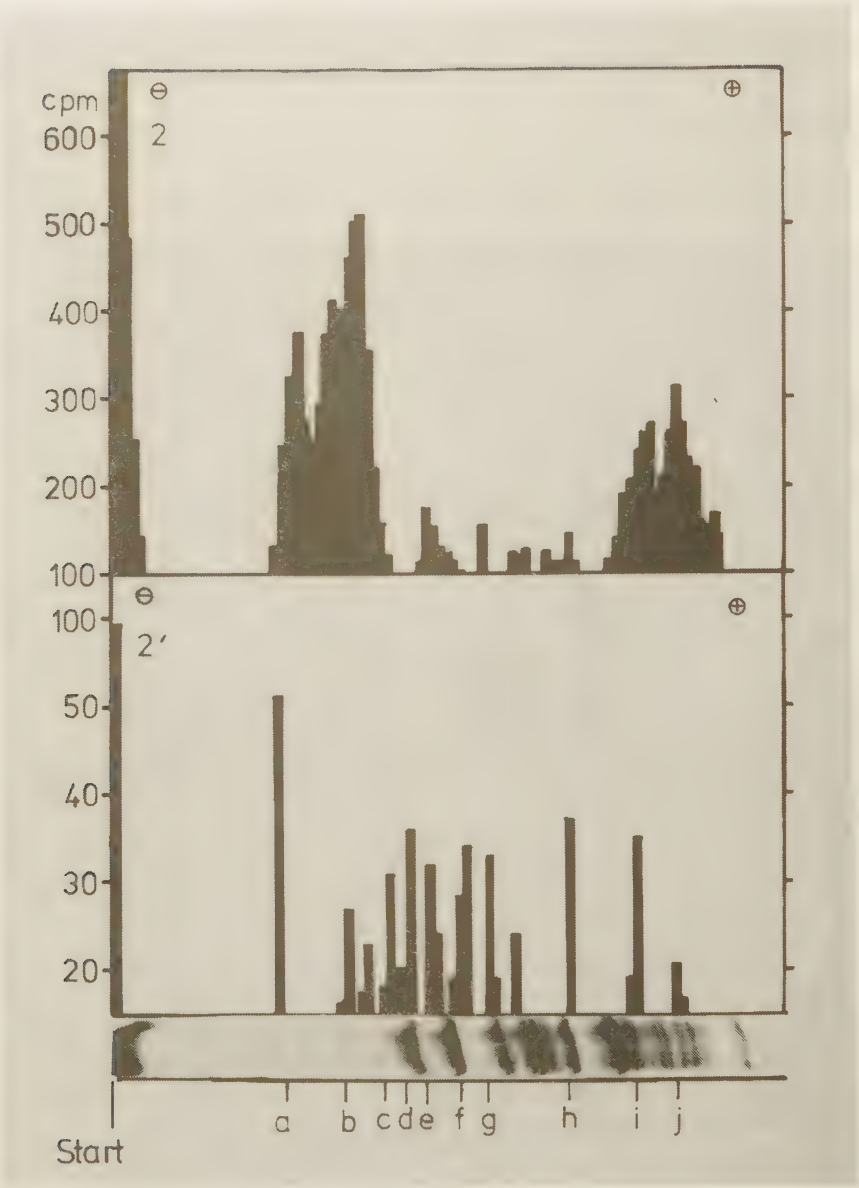


Abb. 17 Sarkosyl-Gel Elektrophorese von 50S Ribosomen aus mit [^{14}C] JAM - modifizierten 70S Ribosomen. 10 facher Überschuß (2') und 100 facher Überschuß (2) an Reagenz in der Inkubationslösung.

Die elektrische Ladung von Lactoferrin bestimmte Koroleva zum erst mit der zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell (1971) genauer. Eine optimale Auftrennung von Fe- und Fe-Lactoferrin von L. acidophilus zeigen die Abbildungen 11 und 12.

Abb. 12 Zweidimensionale Immunelektrophorese von L. acidophilus (Horne & Egan, 1973). 1-D erste Dimension, 2-D zweite Dimension.

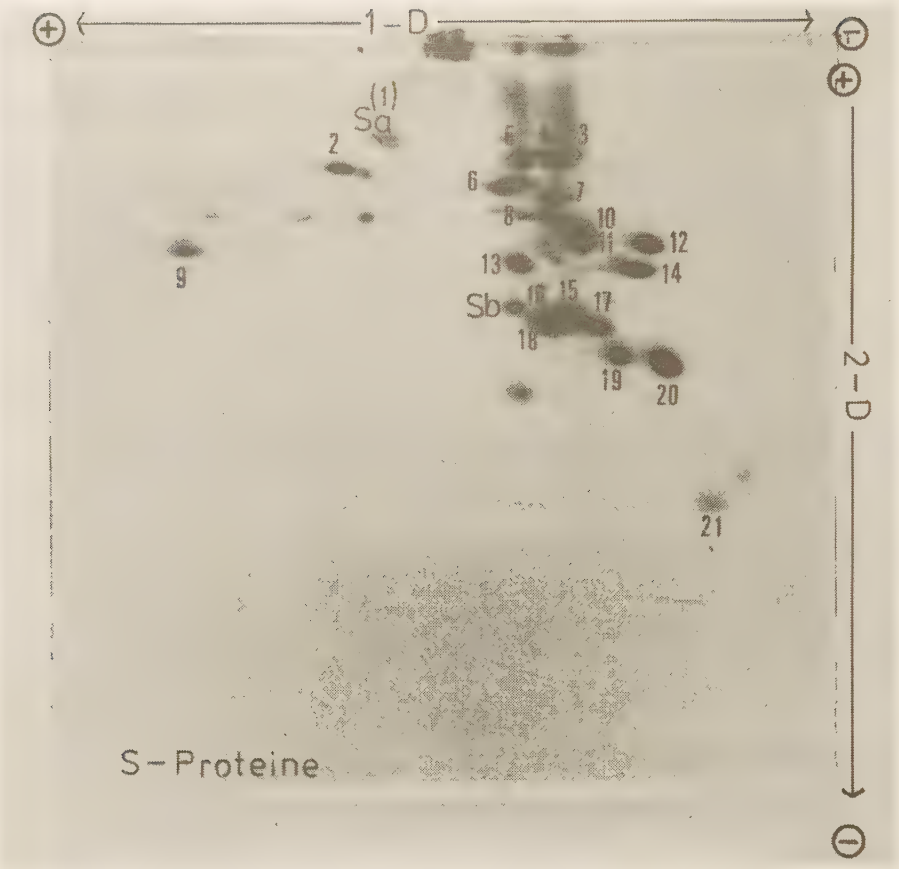


Abb. 19 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gel Elektrophorese von B. stearothermophilus 30S Proteinen (Isono, Isono 1975). 1-D erste Dimension, 2-D zweite Dimension.

Die durch die zweidimensionale Polyacrylamid-Gel Elektrophorese identifizierten [^{14}C] JAcPuro -, [^{14}C] JAM - und [^{14}C] $JAcNH_2$ - markierten Proteine sind in den Abbildungen 20 und 21 zusammengefaßt.

Bei der Markierung von 70S B. stearothermophilus Ribosomen mit [^{14}C] JAcPuro im 10- und 100 fachen Überschuß fanden wir vier Hauptprodukte, die das Reagenz kovalent gebunden hatten: B-L28, B-L36, B-L37/38 und B-S19. [^{14}C] $JAcNH_2$ im 10 fachen Überschuß in der Inkubationslösung markierte hauptsächlichen Protein B-S19. In sehr viel geringerem Maße waren die Proteine der großen Untereinheit modifiziert worden, von denen B-L5/9, B-L14, B-L29, B-L33 und B-L37

vergleichsweise am stärksten getroffen wurden. Bei Erhöhung des Überschusses an [^{14}C] $JAcNH_2$ im Reaktionsgemisch war wiederum eindeutig Protein B-S19 das Hauptprodukt der Reaktion. Von den Proteinen der 50S Untereinheit wurden am stärksten B-L6, B-L16 und B-L28 markiert.

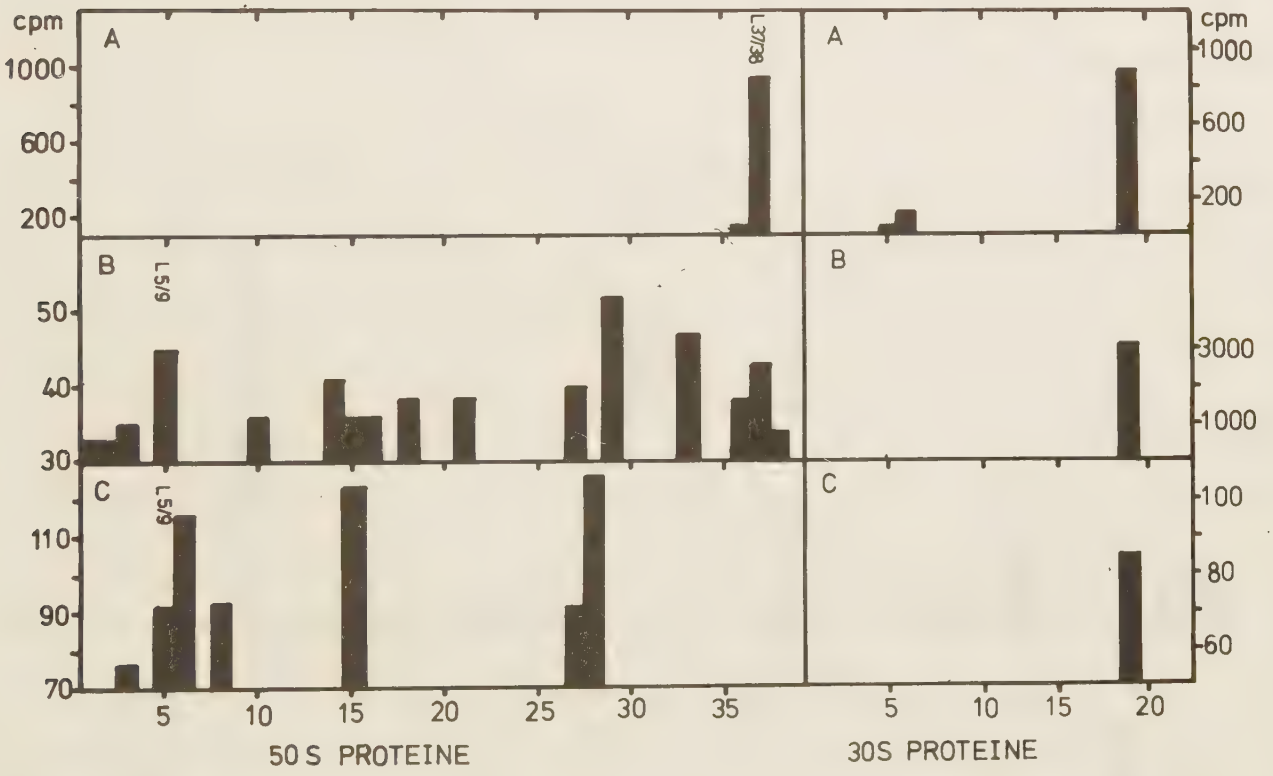


Abb. 20 Markierte 50S- und 30S Proteine von B. stearothermophilus 70S Ribosomen, die im 10 fachen Überschuß mit [^{14}C] JAcPuro (A), [^{14}C] $JAcNH_2$ (B) und [^{14}C] JAM (C) inkubiert worden waren.

Im 10 fachen Überschuß angebotenes [^{14}C] JAM reagiert präferenziell mit den Proteinen B-L6, B-L15, B-L28 und B-S19. Bei 100 fachem Überschuß wurden [^{14}C] JAM hauptsächlich von den Proteinen B-L6, B-L10, B-L13 sowie B-S9, B-S13 und B-S19 gebunden.
Vergleicht man die Ergebnisse der durch [^{14}C] JAcPuro und [^{14}C] $JAcNH_2$ markierten Proteine miteinander, so wird deutlich, daß die kovalente Bindung von [^{14}C] JAcPuro an die Proteine B-L28 und B-S19 nicht spezifisch für dieses Reagenz ist, und daß mit größter

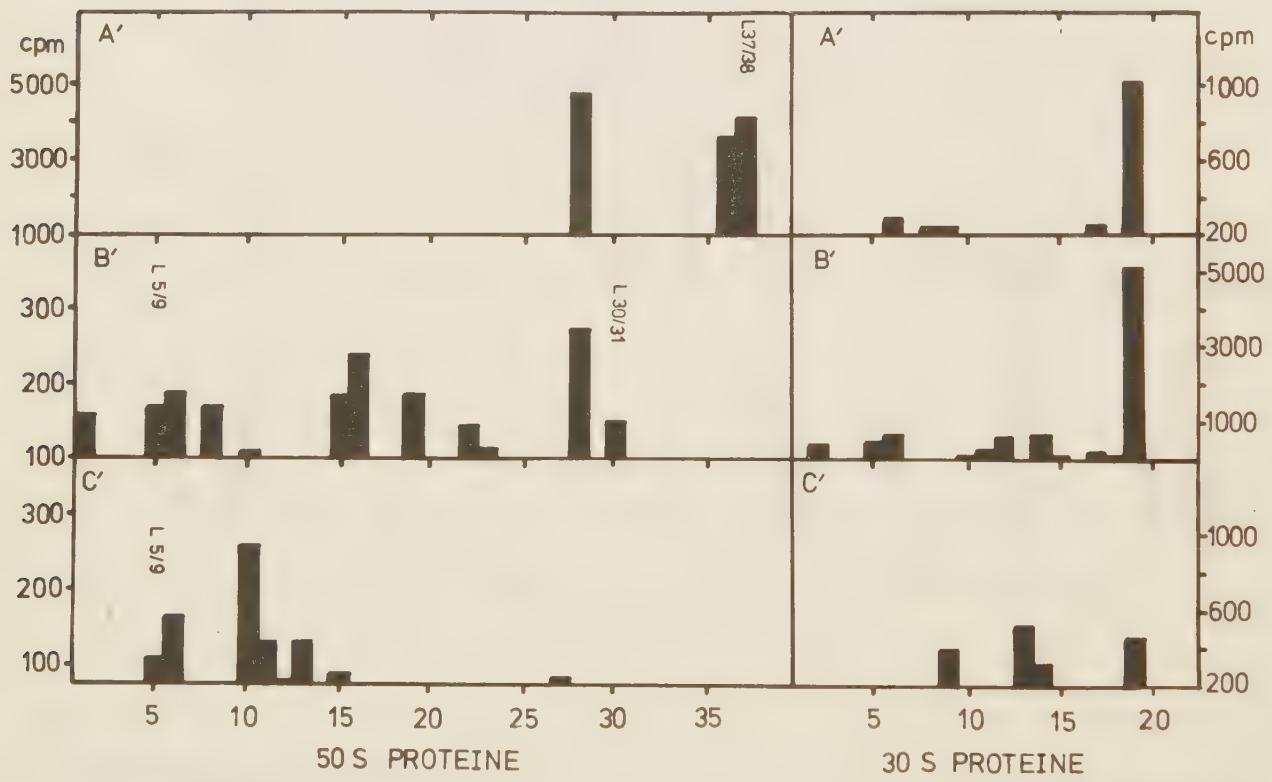


Abb. 21 Markierte 50S - und 30S Proteine von B. stearothermophilus 70S Ribosomen, die im 100 fachen Überschuß mit [^{14}C] - JAcPuro (A'), [^{14}C] $JAcNH_2$ (B') und [^{14}C] JAM (C') inkubiert worden waren.

Wahrscheinlichkeit die Proteine B-L36 und B-L37/38 zu den substratspezifischen Rezeptoren gehören.

Bei der Beurteilung der Substratspezifität der durch [^{14}C] JAM markierten 50S Proteine im Vergleich mit den Ergebnissen der Markierung durch [^{14}C] JAcNH$_2$ ist B-L10 mit größter Wahrscheinlichkeit das spezifische Rezeptorprotein. B-L10 ist zwar erst bei höherem Angebot das Hauptprodukt der [^{14}C] JAM - Reaktion, wir werden jedoch weiter unten noch sehen, daß es weitere Indizien für die Annahme gibt, daß B-L10 der spezifische Rezeptor für [^{14}C] JAM ist. Die Reaktion von [^{14}C] JAM bei 10 fachem Überschuß in der Inkubationslösung mit den Proteinen B-L6, B-L15 und B-L28 ist relativ unspezifisch, weil diese auch mit [^{14}C] JAcNH$_2$ modifiziert wurden. Die Reaktion von [^{14}C] JAM bei 100 fachem Überschuß in der Inkubationslösung mit den Proteinen B-L13, B-S9 und B-S13 wird später noch diskutiert werden.

Es ist wichtig zu erwähnen, daß die während der Essigsäureextraktion ausgefallene und abzentrifugierte ribosomale RNS weniger als 3 % der Radioaktivität enthielt, die in der Proteinfraktion gefunden werden konnte. Die Analyse der Proteine, die aus den Überstandfraktionen der Zonalzentrifugation von [^{14}C] JAM - und [^{14}C] JAcPuro - markierten 70S Ribosomen isoliert werden konnten, ergab keinerlei Hinweise dafür, daß eines dieser fraktionell an Ribosomen gebundenen Proteine signifikante Mengen an Radioaktivität enthielt. Die Proteine, die aus den Überstandsfranktionen der mit [^{14}C] JAM inkubierten 70S Ribosomen isoliert werden konnten, ließen sich in der zweidimensionalen Elektrophorese nicht auftrennen, obwohl bis zu 6 mg Protein zur Analyse eingesetzt wurden. Diese Menge ist viermal so hoch wie gewöhnlich zur Analyse von 50S Proteinen in der zweidimensionalen Elektrophorese dieser Größe verwendet wird. Wahrscheinlich handelte es sich bei diesen aus den Überstandfraktionen iso-

lierten Proteinen um Faktoren mit hohem Molekulargewicht, die in dieser Elektrophorese nicht aufgetrennt wurden.
Die Überstandproteine, die sich aus den mit [^{14}C] JAcPuro modifizierten 70S Ribosomen isoliert werden konnten, enthielten hauptsächlich folgende ribosomale Proteine: B-L2, B-L22, B-L24, B-L28 und B-S9.

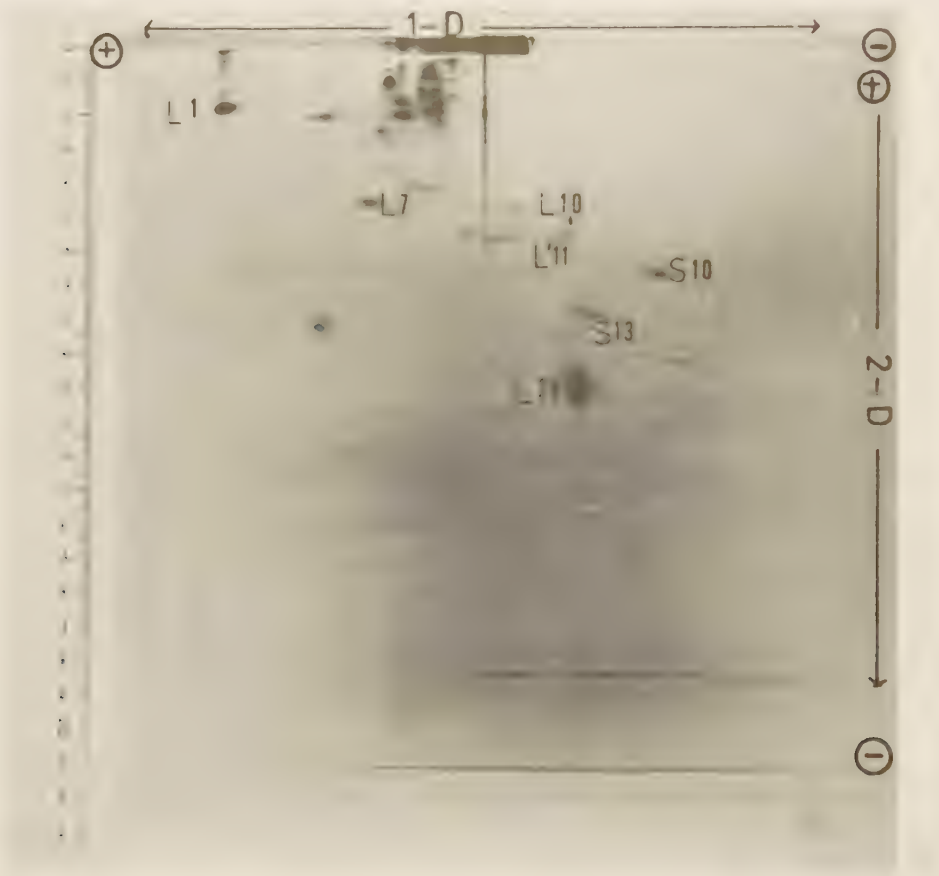


Abb. 22 Zweidimensionale Elektrophorese von Proteinen, die sich durch Waschen mit TMA - Waschpuffer von 70S B. stearothermophilus Ribosomen ablösen ließen. 1-D erste Dimension, 2-D zweite Dimension.

Zum Vergleich wurden auch die Proteine von B. stearothermophilus analysiert, die in der Waschflüssigkeit verblieben, wenn 70S Ribosomen mit TMA-Waschpuffer 12 Stunden lang bei 4° C behandelt wurden. Nach der Auftrennung dieser Proteine in der zweidimensionalen Elektrophorese ließen sich die folgenden ribosomalen Proteine identifizieren: B-L1, B-L7, B-L10, B-L11, B-L28, B-S10 und B-S13 (Abb. 22).

3.5. Funktionsanalyse chemisch modifizierter Ribosomen

Die Ergebnisse aller unter Abschnitt 2.7. beschriebenen Funktionsversuche der verschieden behandelten Ribosomen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die mit [^{14}C] JAcPuro markierten 50S Ribosomen verhalten sich im Poly (U) - System ähnlich wie die mit [^{14}C] $JAcNH_2$ markierten 50S Ribosomen. Wir fanden eine schwache Inhibierung gegenüber der Kontrollaktivität bei niedriger Modifikationsrate, während mit erhöhter Modifikation die Aktivität im Poly(U)-System leicht stimuliert wurde. Die [^{14}C] JAM modifizierten 50S Ribosomen zeigten hier nur eine insgesamt schwache Inhibierung.
Im sensitiveren f2 - mRNS System fanden wir eine drastische Inhibierung der Syntheseleitstung durch [^{14}C] JAcPuro modifizierte 50S Partikel, die für dieses Reagenz wahrscheinlich spezifisch ist. Auch die zu 92 % mit [^{14}C] JAM markierten 50S Ribosomen zeigten hier eine deutlich verminderte Aktivität. Auffallend ist die Stimulierung der Syntheseleistung durch 50S Ribosomen, die zu je 27 % [^{14}C] $JAcNH_2$ und [^{14}C] JAM gebunden hatten. Dieser Befund steht in Einklang mit Ergebnissen, die Traut & Haenni (1967), Moore (1971) mit N-äthylmaleimid und Cronenberger & Erdmann (1975) mit p-Chlormercurbenzoesäure als SH-Gruppen Reagenzien bei Modifikation von E. coli Ribosomen fanden.

In der "Fragment - Reaktion" brachte bis auf die 50S Ribosomen, die zu 92 % mit[^{14}C] JAM markiert waren, keine der Proben signifikante Änderungen gegenüber der Kontrolle. Nach Untersuchungen von Hampl et al. (1976) sind ohnehin nur ca. 1 % der 50S Ribosomen in diesem System aktiv. Die Inhibierung der Fragment-Reaktion durch die zu 92 % mit [^{14}C] JAM modifizierten 50S Ribosomen ist vergleichbar mit der inhibierten Bindung des Fragments C-A-C-C-A [^{3}H] Leu an diese Ribosomen.

Die Bindung des "A-site" spezifischen Fragments C-A-C-C-A [^{3}H] Leu wurde am deutlichsten von den mit [^{14}C] JAM modifizierten 50S Ribosomen inhibiert, was als Hinweis für die "A-site" Bindung dieses Reagenzes betrachtet werden kann. Die übrigen Partikel zeigten hierbei keinen nennenswerten Effekt.
Die Bindung des "P-site" spezifischen Fragments C-A-C-C-A [^{3}H] LeuAc hemmten am deutlichsten die mit [^{14}C] JAcPuro modifizierten 50S Ribosomen, was auf eine "P-site" Orientierung dieses Reagenzes bei der Reaktion mit 70S Ribosomen schließen läßt. Eine deutliche Stimulierung der Bindung dieses Fragments zeigten die mit [^{14}C] $JAcNH_2$ und [^{14}C] JAM modifizierten 50S Ribosomen mit höherer Modifikationsrate, was auf einen ähnlichen Effekt zurückzuführen sein könnte, wie er mit anderen SH-Reagenzien beobachtet wurde (Traut & Haenni, 1967; Moore, 1971; Cronenberger & Erdmann, 1975).

Bei der Hydrolyse von [γ - ^{32}P] GTP plus EF-G zeigten die mit [^{14}C] JAM markierten 50S Ribosomen den deutlichsten Hemmeffekt, der am stärksten bei den zu 92 % markierten Partikeln ausgeprägt war. Inwieweit dieses Ergebnis spezifisch für die Affinitäts-Markierung durch [^{14}C] JAM ist, wird später noch diskutiert werden. Bei den mit [^{14}C] JAcPuro modifizierten Partikeln ergab erst eine stärkere Modifikation einen schwachen Hemmeffekt, während die mit [^{14}C]

ribosomale Untereinheit	Modifi.-rate in %	Poly (U)-System in %	f2 - System in %	Fragment Reaktion in %	Bindung von CACCA - [^{3}H] Leu in %	Bindung von CACCA - [^{3}H] LeuAc in %	Hydrolyse von GTP + EF-G in %	Hydrolyse von GTP - EF-G in %	Hydrolyse von ATP in %
50S (Kontr.)	-	100	100	100	100	100	100	100	100
50S (JAcPu.)	20	75	21	86	96	64	110	80	80
50S (JAcPu.)	200	115	0	96	117	64	70	72	51
50S (JAcNH$_2$)	27	79	150	102	119	117	80	75	59
50S (JAcNH$_2$)	226	100	90	89	92	147	96	58	60
50S (JAM)	27	93	120	97	82	98	85	100	63
50S (JAM)	92	87	41	74	70	132	40	46	67
100 % Aktivität entsprechen cpm		6800	3800	7100	10700	7600	5500	4300	33600

Tab. 2 Ergebnisse der biologischen Funktionsversuche mit modifizierten 50S Ribosomen von B. stearothermophilus. Einzelheiten im Text. 100 % Modifikationsrate bedeutet 1 Mol Reagenz pro Mol 50S Untereinheit. 100% Aktivität im Poly (U) System entsprechen ca. 11 Molen polymerisiertem Phenylalanin pro Mol 50S Ribosom. 100 % Bindung von CACCA[^{3}H] Leu entsprechen 0.27 mMol CACCA[^{3}H] Leu pro Mol 50S Ribosom. 100 % Bindung von CACCA[^{3}H] LeuAc entsprechen 0.2 mMol CACCA[^{3}H] Leu Ac pro Mol 50S Ribosom.

$JAcNH_2$ markierten 50S Ribosomen mit steigender Modifikationsrate einen zunehmend geringeren Aktivitätsverlust zeigten. Die Hydrolyseaktivität von $[\gamma - {}^{32}P]$ GTP in Abwesenheit von EF-G war wiederum am stärksten bei den mit $[{}^{14}C]$ JAM markierten Ribosomen gehemmt.

Schließlich zeigten alle chemisch modifizierten 50S Ribosomen eine relativ deutliche Inhibierung der $[\gamma - {}^{32}P]$ ATP Hydrolyse. Dabei ließ sich jedoch nicht unterscheiden, ob dieser Effekt auf eine spezifische Modifikation durch irgendeines der Reagenzien zurückzuführen war.

3.6. Reaktion von Monojodamphenicol mit B. stearothermophilus

Betrachtet man die vorliegende Arbeit unter einem molekularpharmakologischen Gesichtspunkt, so stellt sich die Frage nach der Vergleichbarkeit von in v i t r o mit in v i v o Ergebnissen. Da Chloramphenicol in der Chemotherapie von Infektionskrankheiten auch heute eine bedeutende Rolle spielt, haben wir diese Substanz und sein Analogon Monojodamphicol in ihrer Wirkung auf B. stearothermophilus - Zellen untersucht. Darüberhinaus haben wir versucht, den (die) Rezeptor(en) der in v i v o Affinitäts-Markierung mit Monojod-[^{14}C] amphenicol zu chrakterisieren.

3.6.1. Effekt von Monojodamphenicol und Chloramphenicol auf die in v i v o Protein- und DNS Synthese

Verschiedene Konzentrationen von Chlor- und Monojodamphenicol wurden zu exponentiell wachsenden Kulturen von B. stearothermophilus in einem Vollmedium gegeben, das, wie unter Abschnitt 2.8.1. beschrieben, mit [^{3}H] - Leucin versetzt war. Zu den in Abb. 23 angegebenen Zeiten wurde der Einbau von [^{3}H] Leucin in Anwesenheit von Monojodamphenicol gemessen. Es wurde gefunden, daß bei Konzentrationen von 30 µg/ml für Chloramphenicol (Ergebnis ist nicht abgebildet) und 100 µg/ml für Monojodamphenicol das Wachstum der Zellen vollständig zum Stillstand kam. Die Dosis für CAM entsprach den Ergebnissen von Messer (1972) und Pongs & Messer (1976), die diese bei ihren Arbeiten mit E. coli fanden. Daß für JAM eine um Faktor 2.3 höhere Dosis angeboten werden mußte, bis die Proteinsynthese völlig unterbrochen war, kann verschiedene Gründe haben, die später noch diskutiert werden. Bei Konzentrationen an JAM, die zwischen 10 µg und 100 µg pro ml lagen, war zwar die Proteinsynthese reduziert; sie stieg jedoch immer noch exponentiell innerhalb des gemessenen Zeitraums an (Abb.23). Die unterschiedlichen Proteinsyntheseraten sollten ein direktes Maß

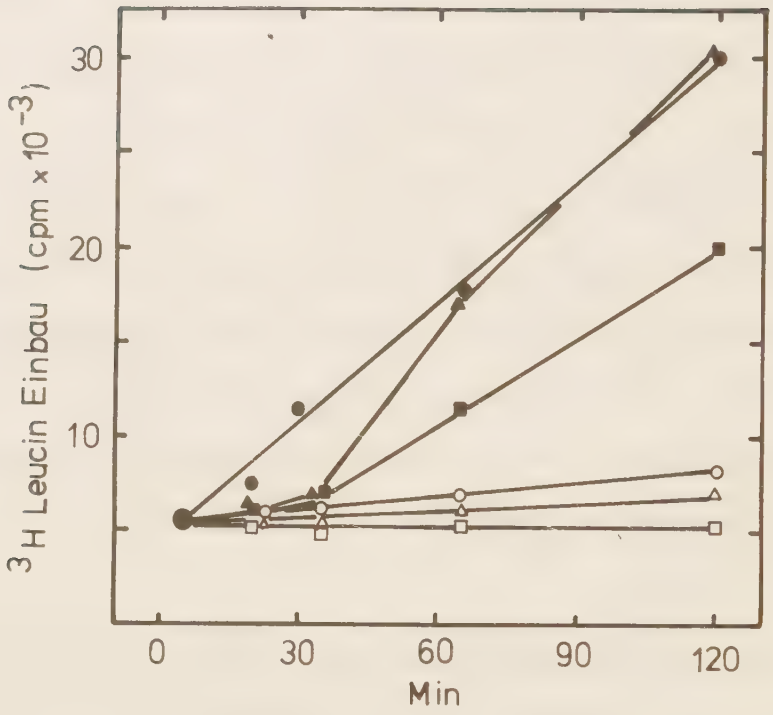


Abb. 23 Effekt von JAM auf die Proteinbiosynthese von B. stearothermophilus unter verschiedenen Konzentrationen an JAM. Kontrolle (●——●), 10 µg/ml- (▲——▲), 30 µg/ml - (■——■), 60 µg/ml - (○——○), 80 µg/ml - (△——△), 100 µg/ml JAM (□——□).

für die Anzahl an Ribosomen sein, die durch JAM entweder nicht getroffen oder in ihrer Aktivität nur geringfügig beeinträchtigt wurden. Es wurde deshalb die relative Proteinsyntheserate berechnet und diese gegen die entsprechende Konzentration an Reagenz in doppelt-logarithmischem Maßstab aufgetragen. Dabei entstand eine Gerade mit einer Steigung von ungefähr -1 (Abb. 24), was bedeutet, daß ein Molekül JAM ausreichte, um die Aktivität eines Ribosoms zu inhibieren. Ähnliche Ergebnisse wurden bei E. coli von Pongs & Messer (1976), Hopps, Wissemann et al. (1956), Das. et al. (1966), Vazquez et al. (1975) und Manyan et al. (1975) gefunden.

Die Änderung der DNS - Synthese unter Einfluß der beiden Reagenzien wurde durch Einbau von [^{3}H] Thymin innerhalb von 5 Minuten Zeiträumen (Pulsmarkierung) in die bakterielle DNS gemessen (Abb. 25). Ein anfänglicher Anstieg der DNS - Syntheseaktivität nach Inhibierung der Proteinsynthese, wie Maaløe & Hanawalt (1961) und Pongs & Messer (1976) sie bei ihren Untersuchungen an E. coli mit CAM fanden,

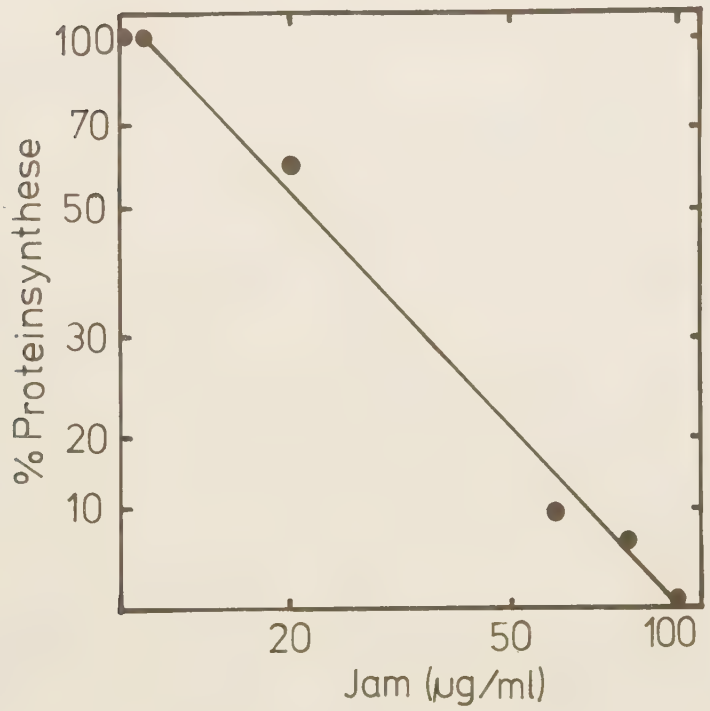


Abb. 24 Relative Proteinsyntheserate bei verschiedenen Konzentrationen an Monojodamphenicol. Proteinsyntheseraten wurden aus den Steigungen der Geraden in Abb. 23 entnommen, gegenüber der Kontrolle (ohne JAM) relativiert und gegen die molare Konzentration von JAM aufgetragen.

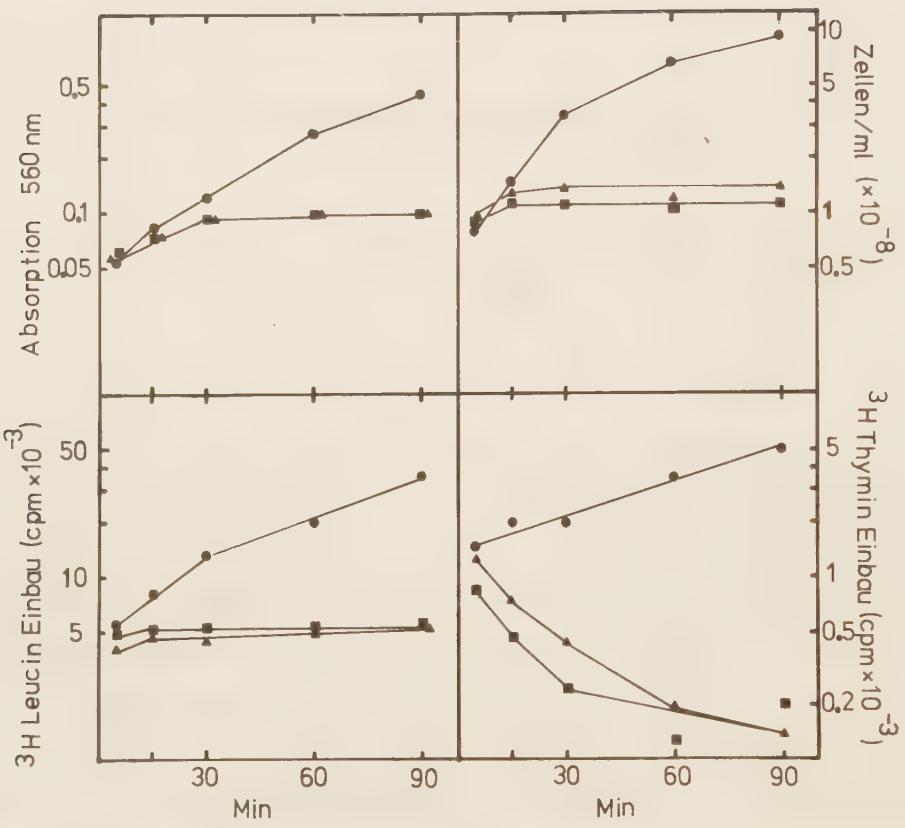


Abb. 25 Effekt von CAM und JAM auf das Zellwachstum, die Proteinbiosynthese und die Synthese von DNS in B. stearothermophilus. Kontrolle (●——●); 85 µg/ml CAM (■——■) und 100 µg/ml JAM (▲——▲) in der Inkubationslösung.

konnte bei B. stearothermophilus mit der Methode der Pulsmarkierung nicht gefunden werden.

Schließlich wurde noch untersucht, wie sich die Zahl der überlebenden Zellen durch die Behandlung mit 85 µg/ml CAM und 100 µg/ml JAM im gemessenen Zeitraum veränderte. Abb. 26 zeigt, daß die Zahl der überlebenden Zellen, die mit JAM inkubiert worden waren, erst nach 30 Minuten ein Niveau erreicht hatte, das dem der mit CAM behandelten Zellen entsprach.

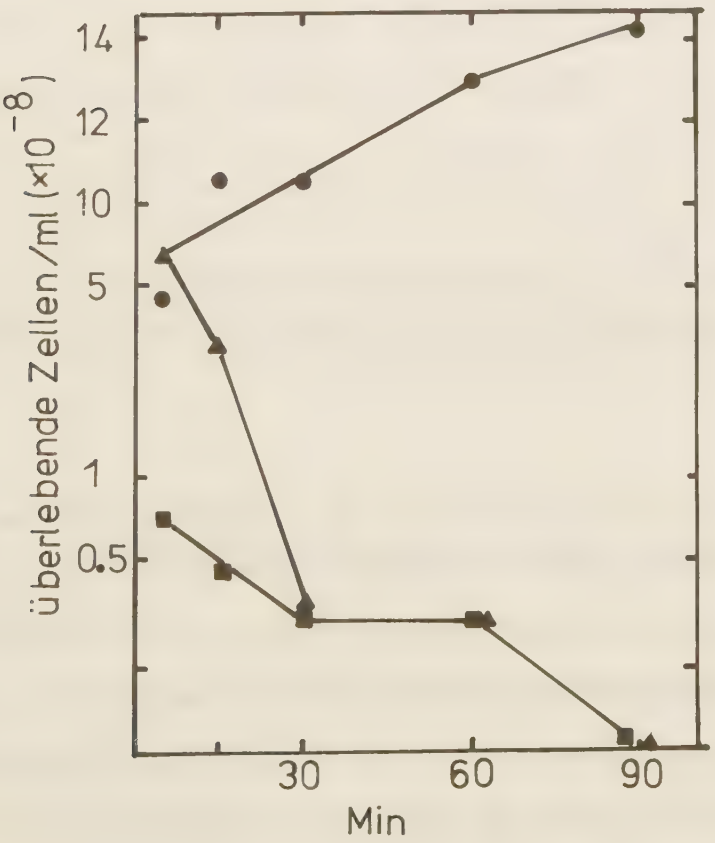


Abb. 26 Effekt von CAM und JAM auf die Anzahl der die Behandlung überlebenden B. stearothermophilus Zellen. Kontrolle (●——●), 85 ug/ml CAM (■——■) und 100 ug/ml JAM (▲——▲) in der Inkubationslösung.

3.7. Reaktion von Monojod [^{14}C] amphenicol mit B. stearothermophilus

Die Verteilung des in den Versuchen A - D (s. Abschnitt 2.8.3.)angebotenen [^{14}C] JAM in den verschiedenen B. stearothermophilus Kulturen ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Versuch	[^{14}C] JAM pro 20ml Kultur cpm	[^{14}C] JAM in geernteten Zellen cpm	% d. angebotenen cpm	[^{14}C] JAM in Essigsäure-extrakt cpm
A	2.3×10^8	3×10^5	0.130	1.3×10^5
B	2.3×10^7	9.9×10^4	0.430	4.8×10^4
C	2.3×10^7	3.6×10^5	1.5	1.9×10^5
D	2.3×10^8	1.7×10^5	0.075	8.4×10^4 (= 64,5 % von A)

Tab. 3 Verbleib des [^{14}C] JAM nach Inkubation mit B. stearothermophilus unter verschiedenen Bedingungen, s. Text.

In allen Ansätzen hatten die Zellen von B. stearothermophilus nur zu einem sehr geringen Anteil mit dem angebotenen [^{14}C] JAM reagiert. Vergleicht man den Anteil der Radioaktivität in den Proteinfraktionen, die durch Essigsäureextraktion gewonnen wurden mit der Gesamtradioaktivität in den geernteten und gewaschenen Zellen, so erkennt man, daß jeweils ca. 50 % in den Proteinfraktionen wiedergefunden wurden. Das bedeutet, daß etwa je die Hälfte des von den Zellen gebundenen [^{14}C] JAM an solchen Zellfraktionen (Zellwand etc.) adsorbiert oder kovalent gebunden war, die sich nicht mit Essigsäure extrahieren ließen. Auffallend ist darüberhinaus, daß trotz 10 fach

höherem Angebot an [^{14}C] JAM in Ansatz A, die Radioaktivität im Essigsäureextrakt von Ansatz C nur um 46 % gesteigert werden konnte (vergl. Tab. 3 Versuch A und C). Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, daß mit 10 µg/ml [^{14}C] JAM in Ansatz C keine letale Dosis für das Zellwachstum und die Proteinsynthese angeboten wurde, so daß bei weiterer Vermehrung von Zellen entsprechend neue Ribosomen und Rezeptoren für das Pharmakon synthetisiert wurden. Im Vergleich dazu ist der Anteil der Radioaktivität in der Essigsäurefraktion von Ansatz B entsprechend geringer, weil hier das Wachstum der Zellen bei einer Zelldichte von ca. 1.2 x 10^8 Zellen/ml durch Zugabe von TMAI - Puffer abgebrochen wurde.
Ansatz D, der mit der gleichen Konzentration an [^{14}C] JAM wie in A behandelt und außerdem mit 85 µg/ml an CAM 30' vorinkubiert worden war, enthielt in seinem Essigsäureextrakt nur 65 % des entsprechenden radioaktiven Anteils von Probe A. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß in v i v o die Bindung von [^{14}C] JAM an seinen spezifischen Rezeptor durch dessen vorhergehende Blockierung durch CAM inhibiert wurde.

3.8. Analyse der Proteinfraktionen, die Monojod [^{14}C] amphenicol gebunden hatten

Die Analyse der Proteine aus den Essigsäureextrakten der Proben A - D wurde mit Hilfe der Elektrophorese auf Sarkosyl-Polyacrylamid-Gradienten Gelen durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Proteine von 50S - und 30S Ribosomen aus den in v i t r o Versuchen, bei denen 70S Ribosomen mit 10 fachem Überschuß an [^{14}C] JAM inkubiert wurden, als Kontrollen mit aufgetrennt. Die Ergebnisse dieser Elektrophorese sind in Abb. 27 zusammengefaßt. Die Profile A - D entsprechen in ihren Bezeichnungen den so gekennzeichneten Proben. Sie geben ungefähr die

quantitativen Proportionen des Einbaus von [^{14}C] JAM in einzelnen ribosomalen Proteinen wieder, die sich mit Essigsäure extrahieren ließen.

Das Profil der radioaktiven Proteinbanden aus Ansatz A zeigte vier Haupt- (Abb. 27, a, b, d und g) und fünf Nebenbanden (Abb. 27, c, e, f,h und i). Die Banden in den anderen Ansätzen wurden diesen innerhalb einer Variationsbreite von 5 Fraktionen zugeordnet, was in der Abbildung etwa 3.5 mm entspricht. Bande g ist im Profil der 30S Kontrollproteine und im Ansatz A und B das Hauptprodukt. Da von den in v i t r o Versuchen bekannt ist, daß das Hauptprodukt unter den 30 S Proteinen bei der Affinitäts-Markierung mit [^{14}C] JAM B-S19 ist, kann mit großer Wahrscheinlichkeit die Bande g diesem Protein zugeordnet werden.

Bei den 50S Kontroll-Proteinen gibt es zwei Hauptbanden (a und b). Bande a wird relativ stark in Ansatz B markiert, ist Hauptbande in Ansatz C und ist auch noch in Ansatz A markiert. Die Banden b und c sind in ähnlichen Proportionen in den Proben A und C vorhanden. Vergleicht mandie Banden der Ansätze A und D miteinander, die bis auf die Vorinkubation mit CAM unter ähnlichen Bedingungen entstanden sind, so fällt auf, daß die Bande g in Probe D zwar noch deutlich vorhanden, aber schwächer radioaktiv markiert ist, während die Banden a und b keine signifikanten Mengen an Radioaktivität gebunden hatten. Zieht man das Ergebnis von Ansatz C hinzu, wo Bande a das Hauptprodukt darstellt, so liegt der Schluß nahe, daß das Protein in Bande a das spezifische Rezeptorprotein sowohl für CAM als auch für [^{14}C] JAM und darüberhinaus mit einem 50S Protein korrelierbar ist.

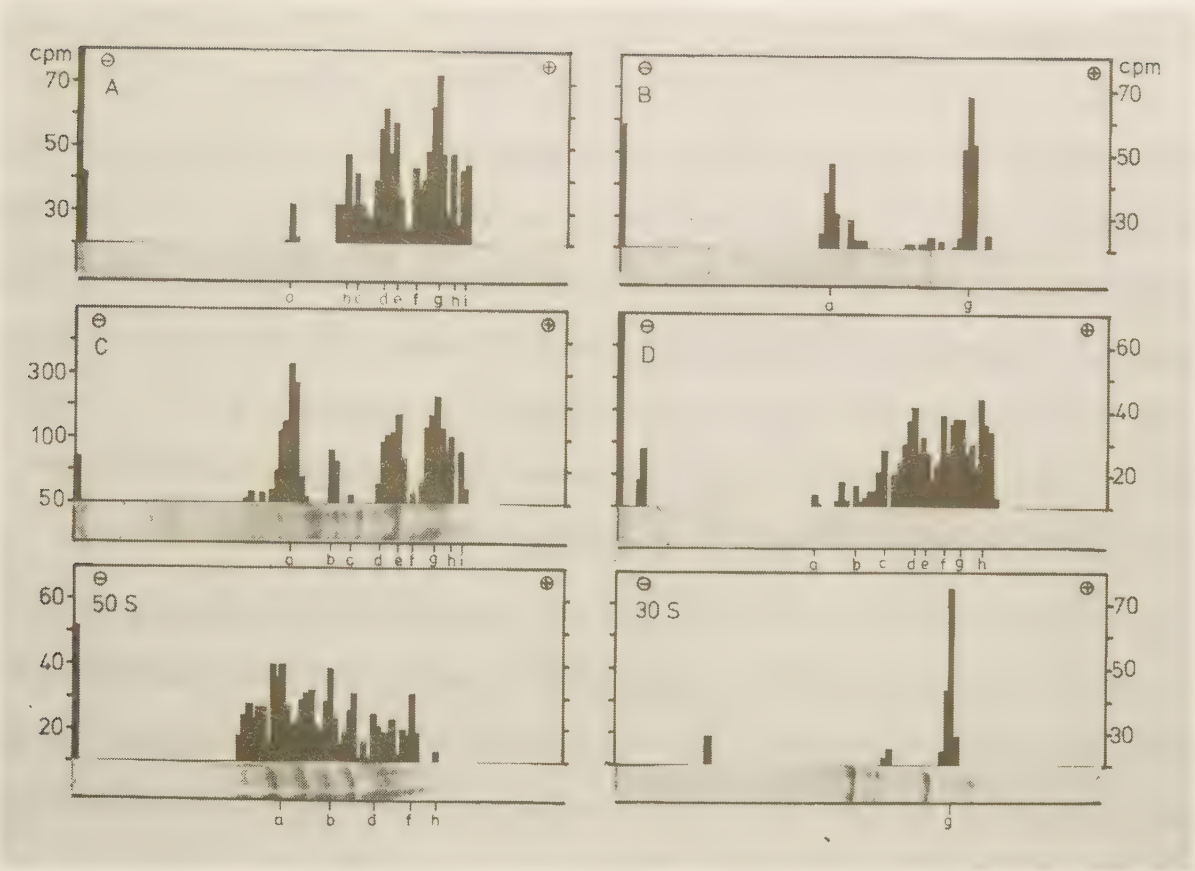


Abb. 27 Sarkosyl Gradienten-Gel Elektrophorese von Proteinen, die in v i v o mit [^{14}C] JAM unter verschiedenen Bedingungen (s.u.) markiert wurden und mit 66%iger Essigsäure aus B. stearothermophilus Zellen extrahiert werden konnten. Als Kontrolle dienten 50S- und 30S Proteine, die aus 70S Ribosomen isoliert wurden, die im 10 fachen Überschuß mit [^{14}C] JAM zwei Stunden lang bei 50°C inkubiert worden waren. Inkubationsbedingungen für Probe A: 100 µg/ml [^{14}C] JAM, 60°C, 90 Minuten Inkubationsdauer entspr. einer Zelldichte von ca. 1.2 x 10^8 Zellen/ml; für Probe B: 10 µg/ml [^{14}C] JAM, 60°C, Inkubationsdauer bis zu einer Zelldichte von ca. 1.2 x 10^8 Zellen/ml; Probe C: 10 µg/ml [^{14}C] JAM, 60°C, Inkubationsdauer 2 Stunden; Probe D: 85 µg/ml CAM, 60°C, 30 Minuten, dann Zugabe von 100 µg/ml [^{14}C] JAM, und weitere Inkubation für 90 Minuten (s.a. Abschnitt 2.8.3.)

4. DISKUSSION

Mit der Methode der Affinitäts-Markierung hat es in den letzten Jahren bemerkenswerte Fortschritte bei der Strukturaufklärung des ribosomalen Peptidyltransferasezentrums und anderer aktiver Zentren, insbesondere von E. coli, gegeben. Eine gute Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeiten liegt in einem Übersichtsartikel von Cantor, et al. (1974) vor, dem die in Abb. 28 wiedergegebene schematische Zusammensetzung des Pepdidyltransferasezentrums von E. coli entnommen wurde.

Ein Hauptproblem bei der Arbeit mit Affinitäts-Markierungsreagenzien ist es, zu differenzieren zwischen spezifischer und unspezifischer Reaktion mit einem Rezeptor. Die in dieser Arbeit verwendeten Halocarbonyl-Derivate können mit einer Reihe von nukleophilen Reaktionspartnern, z.B. Histidin, Lysin, Tyrosin, Methionin, Cystein etc. Gurd (1967) kovalente Bindungen eingehen, von denen jedoch die Reaktion mit SH-Gruppen bevorzugt ist.

Wir hatten versucht, durch das Angebot unterschiedlicher Konzentrationen an Reagenzien, das Gleichgewicht zwischen Substrat und Rezeptor zu variieren und durch den Einsatz von Jodacetamid zwischen spezifischer und unspezifischer SH-Reaktion zu unterscheiden. Die funktionelle Gleichwertigkeit oder zumindest Ähnlichkeit der chemisch modifizierten Analoga mit den jeweiligen nichtmodifizierten Antibiotika, sollte mit den Funktionsversuchen gezeigt werden.

Für den Inhibitoreffekt von Puromycin auf die Proteinbiosynthese ist die freie α-NH_2 Gruppe des p-Methoxy- L -phenylalanin Anteils essen-

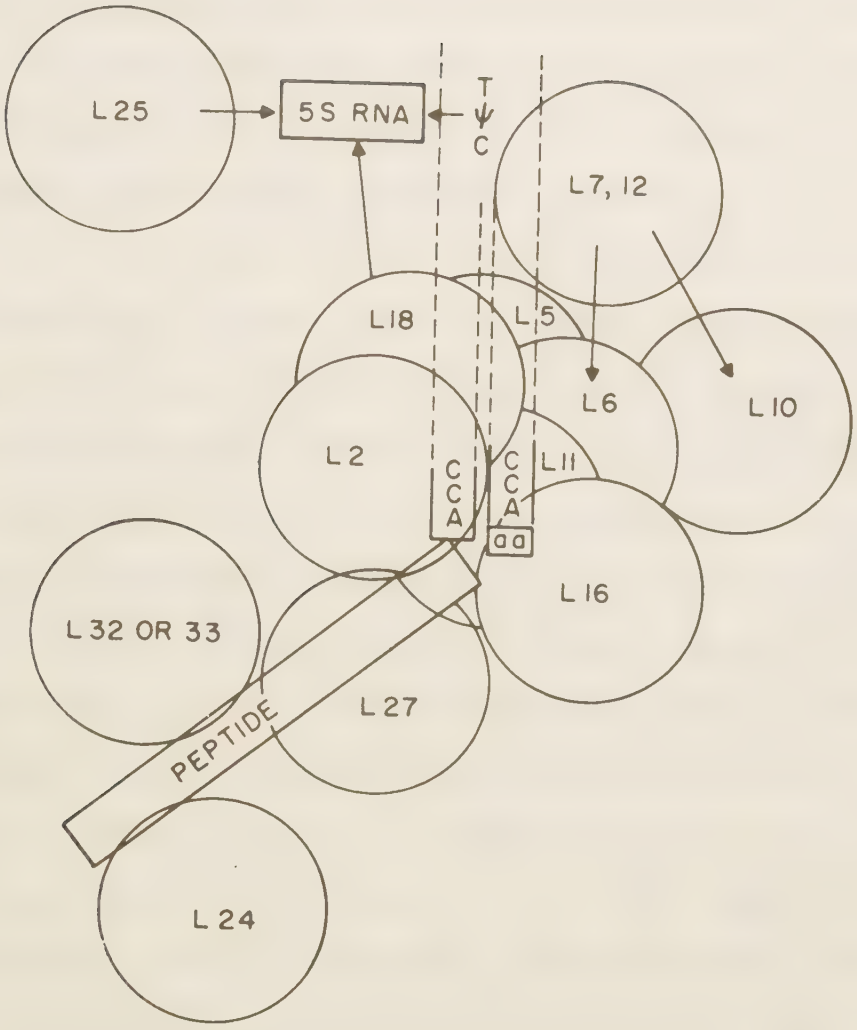


Abb. 28 Schematische Zusammensetzung des Peptidyltransferasezentrums von E. coli, wie sie mit Hilfe der Affinitäts-Markierung bisher aufgeklärt werden konnte. Einzelheiten sind in der Arbeit von Cantor, et al. (1974) beschrieben.
Die hierin gekennzeichneten E.coli Proteine entsprechen ihrer elektrophoretischen Identität nach folgenden B.stearothermophilus Proteinen (Horne & Erdmann, unveröffentlichte Ergebnisse):

E.coli	B.stearo.	E.coli	B.stearo.	E.coli	B.stearo.
E-L2	B-L3	E-L10	?	E-L24	?
E-L5	B-L5	E-L11	B-L10	E-L25	?
E-L6	B-L6	E-L16	?	E-L27	?
E-L7/12	B-L13	E-L18	B-L22	E-L32/33	B-L37/38

tiell. Durch die Acetylierung dieser NH_2-Gruppe wird die Eigenschaft von Puromycin wesentlich geändert, und es muß als Analogon von N-Peptidylpuromycin betrachtet werden, dem Produkt der "Puromycin" bzw. "Fragment - Reaktion" (Monro et al. 1968, Monro 1971). Daher sollte JAcPuro gegenüber dem Peptidyltransferasezentrum eine "P-site" Orientierung einnehmen, wofür die Daten der Reaktionskinetik (Abb. 10) bereits einen Hinweis erbrachten.

Die hierbei beobachtete Stimulierung der Bindung von JAcPuro an 70S Ribosomen in Gegenwart von Puromycin und an solche 70S Ribosomen, die zuvor mit Puromycin gewaschen wurden, läßt sich am besten wie folgt interpretieren: Die Vorinkubation mit Puromycin bewirkte das Freisetzen von noch an 70S Ribosomen befindlicher Peptidyl-tRNS, so daß eine zusätzliche Bindungsstelle für das Reagenz geschaffen wurde. Einen ähnlichen Effekt fanden Stahl et al. (1974) bei ihren Untersuchungen mit N-Bromacetylpuromycin an Rattenleberribosomen. Denkbar wäre jedoch auch eine Aktivierung des Peptidyltransferasezentrums durch Puromycin nach einer Art "induced fit" Mechanismus, der eine erhöhte Reaktion des Reagenzes bewirkt. So haben z.B. Miskin & Zamir (1974) an E. coli 50S Ribosomen eine zwei- bis fünffache Steigerung der Peptidyltransferase - Aktivität beobachtet, wenn diese in Gegenwart verschiedener Antibiotika gemessen wurde. Sie schrieben diesen Antibiotika einen allosterischen Effekt auf eine Konformationsänderung der Ribosomen zu, die in der erhöhten enzymatischen Aktivität Ausdruck fand. Auch Celma et al. (1970) hatten eine erhöhte Affinität des "P-site" spezifischen Fragments C-A-C-C-A-LeuAc an das Peptidyltransferasezentrum unter dem Einfluß von einigen Antibiotika (Chloramphenicol, Erythromycin, Gougerotin, Tetracyclin etc.) gefunden, die mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmen.

Ein zusätzliches Indiz für die Reaktion von JAcPuro in der ribosomalen "P-site" und in der Nähe des Peptidyltransferasezentrums brachten Bindungsversuche von C-A-C-C-A - [^{3}H] LeuAc an die entsprechend modifizierten 50S Ribosomen. JAcPuro zeigte ebenfalls eine Inhibitor-Wirkung auf die Polyuridylsäure abhängige Polyphenylalanin-Synthese und besonders auf die f2 - mRNS abhängige Proteinsynthese (s. Tab. 2). Weil die Translation der f2 - mRNS den genauen Ablauf der Initiation und die Bindung von fMet $tRNS_F^{Met}$ in die ribosomalen "P-site" voraussetzt, kann in der deutlichen Hemmung der Proteinsynthese in diesem System ein weiterer Beweis für die "P-site" Reaktion von JAcPuro gesehen werden.

Als spezifische Rezeptorproteine für JAcPuro waren B-L36 und B-L37/38 identifiziert worden. Proteine B-L37/38 sind in der zweidimensionalen Elektrophorese nicht deutlich voneinander getrennt. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein einziges Protein, was auch von Cohlberg & Nomura (1976) diskutiert wird. Protein B-L36, das nur als schwacher Fleck auf dem Gel zu finden war (Abb. 18), wird von denselben Autoren als mögliches Derivat von Protein B-L38 angesehen. Nur die Sequenzanalyse dieser Proteine kann eine eindeutige Aufklärung über deren Identität geben. Von dem Wanderungsverhalten in der zweidimensionalen Elektrophorese her entspricht Protein B-L37/38 dem E. coli Protein E-L32/33 (Erdmann, unveröffentlicht). E-L33 gehört zu jenen Proteinen, die durch Affinitäts - Markierungsversuche mit Bromacetyl-Peptidyl-tRNS als Bestandteil der ribosomalen "P-site" identifiziert und in der Nähe des Peptidyltransferasezentrums lokalisiert ist (Cantor et al. 1974). Unsere Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit diesen Daten, so daß wir schließen, daß B-L37/38 Bestandteil der ribosomalen "P-site" von B.stearothermophilus ist und JAcPuro an der "P-site" bindet. Die Markierung des 30S Proteins B-S19, das dem

E. coli Protein E-S18 entspricht (Isono et al. 1973; Yaguchi et al. 1974), steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die Pongs et al. 1973 a) bei Affinitäts-Markierungs Versuchen an E. coli Ribosomen mit demselben Reagenz erzielten. E-S18 und B-S19 enthalten eine sehr reaktive SH-Gruppe (Moore, 1971; Cronenberger & Erdmann, 1975; Yaguchi et al. 1974; Yaguchi, 1975), sind darüberhinaus Hauptprodukte der $JAcNH_2$-Reaktion und sind daher wahrscheinlich unspezifische Rezeptorproteine für JAcPuro.

Die vor allem durch JAcPuro markierten E. coli Proteine waren in der Arbeit von Pongs et al. (1973 a) E-L6, E-L2 und E-S14, was nicht in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Ergebnissen bei B.stearothermophilus steht. Eine Erklärung dafür könnte die unterschiedliche Verfügbarkeit und Reaktivität nukleophiler Gruppen der betreffenden Proteine sein. E-L2 ist darüberhinaus in der ribosomalen "P-site" lokalisiert (Cantor et al. 1974, Abb. 28) und E-L6 liegt in unmittelbarer Nachbarschaft und wird als eines der Peptidyltransferase-Proteine betrachtet (Pongs et al. 1974).

Ein anderes Derivat von Puromycin, das als Affinitäts - Markierungsreagenz bei E. coli eingesetzt und an der 5' OH-Gruppe chemisch modifiziert wurde, hatte primär mit der 23S RNS reagiert (Harris et al. 1973). In Übereinstimmung mit diesem Befund stehen auch die Ergebnisse, die Yukioka et al. (1975) mit N-Jodacetylphenylalanyl - tRNS erhielten. Wir konnten dagegen nicht feststellen, daß signifikante Mengen von JAcPuro an die 23S oder die 5S RNS von B. stearothermophilus gebunden hatten. Da jedoch bekannt ist, daß die Proteine E-L6 und E-L2 die Bindung der 23S RNS an den 5S RNS - Proteinkomplex stimulieren (Gray & Monier, 1972), ist wahrscheinlich ein Teil der 23S

RNS bei E. coli um Proteine in der Nähe des oder direkt im Peptidyltransferasezentrum lokalisiert.

Über den molekularen Wirkungsmechanismus von Chloramphenicol hat es in den letzten Jahren eine Vielzahl von Untersuchungen gegeben. Eine Zusammenfassung dieser Arbeiten bieten Übersichtsartikel von Pesta (1971), Vazquez (1974) und Hahn & Grund (1974).

Das Antibiotikum bindet an die 50S Untereinheit von Ribosomen aus Bakterien, Chloroplasten und Blau-Grün Algen (Vazquez, 1974) sowie Mitochondrien (Manyan et al. 1975). Eine bakteriostatische Wirkung des Pharmakons besitzt nur das natürlich vorkommende D - (-) - threo Isomer (Maxwell & Nickel, 1954). Für die aromatische Nitro-Gruppe kann eine Reihe elektronegativer Gruppen ohne wesentlichen Verlust der biologischen Aktivität substituiert werden (Manyan et al., 1975; Hahn & Grund, 1974). Die Acylseitenkette ist dagegen für die optimale Wirkung essentiell (Manyan et al., 1975). Die Substitution der beiden Chloratome durch ein Jodatom in dem von uns verwendeten Substrat hatte deshalb von vornherein keine derartig veränderte Umorientierung gegenüber dem CAM Rezeptor erwarten lassen, wie wir sie bei JAcPuro beobachten konnten.

Einige Autoren haben für CAM eine Bindungsstelle pro Ribosom vorgeschlagen (Das et al., 1966; Wolfe & Hahn, 1965; Hurwitz & Braun, 1968). Neuere Arbeiten von Nierhaus & Nierhaus (1973) sowie die Ergebnisse der in v i v o Versuche mit JAM von Pongs & Messer (1976) bei E. coli und dieser Arbeit bei B. stearothermophilis stehen mit diesen Befunden in Übereinstimmung. Allerdings sind auch zwei Bindungsstellen für CAM diskutiert worden (Das et al. 1966; Lesard & Pestka, 1972). CAM inhibiert die Transpeptidierung auf der 50S Untereinheit von Ribosomen, was in zell-freien Systemen gezeigt werden konnte (Goldberg & Mitsugi, 1967; Coutsogeorgopoulos, 1967; Pestka, 1970; Tanaka et al.,

1971). Als möglicher Inhibierungsmechanismus wurde von Das et al. (1966) eine Konkurrenz des Antibiotikums mit dem Carboxyl-Ende der Aminosäure, die mit der Peptidyl-tRNS verknüpft ist, um einen Rezeptor, der diese tRNS bindet, vorgeschlagen. Auch Hopps et al. (1956) hatten strukturelle Analogien vom CAM zu einigen Aminosäuren diskutiert. Durch Konkurrenzversuche mit Puromycin konnte jedoch gezeigt werden, daß CAM an der ribosomalen "A-site" mit dem Peptidyltransferase-zentrum interferiert (Vazquez, 1974; Lesard & Pestka, 1972; Monro & Vazquez, 1967; Fernandez-Munoz et al., 1971). Diese Ergebnisse wurden durch Daten von Celma et al. (1971), die eine völlige Inhibierung der U-A-C-C-A-Leu Bindung unter "Fragment-Reaktions" Bedingungen durch dieses Antibiotikum zeigen konnten, bestätigt. Nierhaus & Nierhaus (1973) konnten darüberhinaus zeigen, daß das Oligonukleotid C-C-A die Bindung von CAM ebenso wirkungsvoll wie Puromycin reduzierte,und daß für eine schwache Hemmung sogar das Fragment C-A ausreichte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß CAM an der ribosomalen "A-site" mit den letzten zwei oder drei Nukleotiden des 3'-Endes der aa - tRNS konkurriert,und daß die Rezeptoren von CAM und Puromycin, wenn nicht identisch, doch zumindest in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem Ribosom angeordnet sind.
Die Ergebnisse der Reaktionskinetik dieser Arbeit mit JAM unter dem Einfluß von Puromycin stehen nicht im Widerspruch zu den genannten Befunden. Die erhöhte Bindung von JAM an die Ribosomen unter dem Einfluß von Puromycin läßt sich ebenfalls zurückführen auf einen allosterischen Effekt, der durch Puromycin selbst oder durch die Freisetzung restlicher Peptidyl-tRNS hervorgerufen wurde. Außerdem könnte, bedingt durch die mangelnde Verfügbarkeit an reaktiven Gruppen am CAM - Rezeptor, das Reagenz in dessen unmittelbarer Nachbarschaft reagiert haben, wo aber eine Inhibierung durch Puromycin nicht mehr wirksam wird.

Was immer auch der Grund für die beobachtete Stimulierung der Bindung von JAM durch die Vorinkubation der Ribosomen mit Puromycin ist, das Reagenz hatte vor allem in der ribosomalen "A-site" reagiert, wie die Bindungsdaten von C-A-C-C-A -Leu an die im unterschiedlichen Ausmaß modifizierten 50S Ribosomen andeuten. Darüberhinaus geben die Ergebnisse der GTPase-Reaktion einen Hinweis dafür, daß das Reagenz wahrscheinlich im oder am ribosomalen GTPase-Zentrum von B. stearothermophilus gebunden wurde.

Horne (1974) konnte vor kurzem zum ersten Mal zeigen, daß GTPase und ATPase-Aktivitäten an zwei enzymatischen Zentren des 5S RNS - Protein-Komplexes von B. stearothermophilus und E. coli gebunden sind. Die dazugehörigen Proteine sind für B. stearothermophilus B-L5, B-L22 und in geringerem Maße B-L10, B-L6, B-L26 und B-L27 sowie für E. coli E-L5, E-L18, E-L25 und Spuren von E-L20 und E-L30. Von der 5S RNS ist bekannt, daß sie für die 50S Untereinheit strukturell und funktionell von Bedeutung ist (Erdmann et al. 1971; Wrede & Erdmann, 1973). Protein B-L5 konnte z.B. bei Rekonstitutionsversuchen nicht ohne die 5S-RNS in die große Untereinheit eingebaut werden (Horne & Erdmann, 1972). Darüberhinaus ist die 5S RNS an der Bindung der tRNS an die 50S Untereinheit beteiligt, indem die 5S RNS Sequenz -C-G-A-A-C mit der GTΨCPu - Sequenz von tRNS in Wechselwirkung tritt (Forget & Weissmann, 1967; Erdmann, Sprinzl & Pongs, 1973; Richter, Erdmann & Sprinzl, 1974a,b; Richter, Erdmann & Sprinzl, 1973).

JAM hatte in den hier beschriebenen in v i t r o Versuchen bei 10 fachem Überschuß in der Inkubationslösung vor allem mit den Proteinen B-L6 und B-L15 reagiert, wovon Protein B-L6 Bestandteil des erweiterten 5S RNS Komplexes ist, wie er von Horne & Erdmann (1972) beschrieben wurde. Während Protein B-L15 bisher keinem E. coli Protein

eindeutig zugeordnet werden konnte, ist Protein B-L6 nach der zweidimensionalen Elektrophorese mit dem Protein E-L6 korrelierbar. Bei 100 fachem Überschuß an JAM wurde jedoch vor allem Protein B-L10 markiert, daneben auch B-L6, B-L13 und die 30S Proteine B-S9 und B-S13. Auch B-L10 gehört dem erweiterten 5S RNS - Protein Komplex an und entspricht seinem Verhalten in der zweidimensionalen Elektrophorese nach dem E. coli Protein E-L11. B-L13 entspricht dem E. coli Protein E-L7/12 (Cohlberg & Nomura, 1976; Horne & Erdmann, unveröffentlicht). Es wurde bereits in Abschnitt 3.4. erörtert, daß im Vergleich mit den durch $JAcNH_2$ markierten Proteinen die Bindung von JAM an B-L10 und in geringerem Maße an B-L13 spezifisch ist. Die erst bei erhöhter Modifikationsrate bevorzugte Markierung von B-L10 könnte darüberhinaus korrelierbar sein mit der an diesen Ribosomen beobachteten GTPase-Inaktivierung. Daten von Maasen & Möller (1974; 1975) stehen in Übereinstimmung mit den hier vorgelegten Ergebnissen. Diese Autoren hatten u.a. in Gegenwart von Fusidinsäure und EF-G den 4-Azidophenylester von GDP durch UV-Bestrahlung an B. stearothermophilus und E. coli Ribosomen gebunden. Es ist bekannt, daß Fusidinsäure den Komplex GDP-Ribosom-EF- G stabilisiert und so die Bindung von aa - tRNS verhindert (Vazquez, 1974). Hauptprodukt der Reaktion in den Arbeiten von Maasen & Möller waren B-L10 und in geringerem Maße B-L22 und bei E. coli E-L5, E-L11, E-L13, E-L18 und E-L30. Rekonstitutionsversuche von Nierhaus & Montejo (1973) hatten Hinweise ergeben, daß E-L11 selbst die Peptidyltransferaseaktivität besitzt oder zumindest Teil dieses enzymatischen Zentrums ist. Neuere Ergebnisse,die Schrier & Möller (1975) mit derselben Methode erzielten, deuten auf eine Beteiligung von Protein E-L11 an der EF-G abhängigen GTP - Hydrolyse - Reaktion hin, was, da E-L11 mit B-L10 vergleichbar ist, ebenfalls mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.

Pongs et al. (1973 b) hatten mit JAM Protein E-L16 markiert und auch Nierhaus & Nierhaus (1973) hatten dieses Protein als das CAM - Bindungsprotein identifiziert. Wir konnten kein 50S Protein bei B. stearothermophilus finden, daß durch JAM modifiziert und gleichzeitig mit E-L16 korrelierbar wäre. Allerdings konnte von Dietrich et al. (1974) die unmittelbare Nachbarschaft von Protein E-L16 und E-L11 auf dem Ribosom und deren gegenseitige Beeinflussung zusammen mit Protein E-L 6 bei Bindung von CAM gezeigt werden.
Von den 50S Proteinen E-L7 und E-L12 ist bekannt, daß sie eine Schlüsselrolle bei der Bindung der Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G spielen. Sie sind daher notwendig für die EF-G abhängige GTP-Hydrolyse, die Translokation und die enzymatische tRNS - Bindung (Lelong et al. 1974). Über die Topographie von E-L7/12 s. Abb. 1. Die neueren Rekonstitutionsergebnisse von Cohlberg & Nomura (1976) sowie Horne & Erdmann (unveröffentlicht) sprechen für die elektrophoretische Identität von B-L13 und E-L7/12. Die Daten dieser Arbeit, die mit der Affinitäts-Markierung von B. stearothermophilus Ribosomen mit JAM gefunden wurden, stehen in Übereinstimmung mit den bisher bei E. coli gefundenen Ergebnissen über die Nachbarschaft des GTPase - und des Peptidyltransferase-Zentrums (Möller, 1974) und über die strukturelle Beteiligung mehrerer ribosomaler Proteine an diesem Enzymkomplex.

Von den durch JAM modifizierten 30S Protein läßt sich bisher nur Protein B-S13 dem E. coli Protein E-S10 zuordnen (Isono et al., 1973), von dem bekannt ist, daß es an der Bindung von f-Met-tRNS$_f^{Met}$ und aa-tRNS beteiligt ist (Lelong et al. 1974). Die durch JAM modifizierten 30S Proteine B-S9 und B-S13 sind möglicherweise an der Grenzfläche der kleinen Untereinheit zwischen 30S - und 50S Ribosomen angeordnet.

Die in dieser Arbeit mit JAM an B. stearothermophilus - Kulturen durchgeführten Untersuchungen sollten auf einige Fragen Antwort geben: Ist die bakteriostatische Wirkung von Monojodamphenicol der von Chloramphenicol ähnlich? Wie spezifisch ist eine in v i v o Reaktion von JAM? Reagiert das Analogon mit einer ganzen Reihe von Zellkomponenten, oder reagiert es nur an einem spezifischen Rezeptor?

Die Inhibitor-Wirkung von CAM auf die in v i v o Proteinbiosynthese ist von einer Reihe von Autoren beschrieben worden (Hahn & Grund, 1974; Messer, 1972; Pongs & Messer , 1976). Pongs & Messer (1976) benötigten für die völlige Inhibierung der Proteinbiosynthese bei E. coli jeweils Konzentrationen von 30 µg/ml an CAM und JAM. Manyan et al. (1975) fanden ebenfalls bei E. coli, daß 30 µg/ml CAM und eine äquivalente Menge des N - Dibromacetyl Analogons ausreichten, um die Proteinbiosynthese vollständig zu unterbrechen. Dieselbe Dosis an CAM reichte in unseren Versuchen aus, um die Proteinsynthese bei B. stearothermophilus vollständig zu hemmen. Allerdings lag die für diesen Effekt benötigte Dosis an JAM um das 2.3 fache höher, was möglicherweise mit Transportproblemen des Pharmakons durch die äußere Membran von B. stearothermophilus zusammenhängt. Hahn und Grund (1974) haben für CAM und einige Analoga, die in der Acylseitenkette der Verbindung variiert waren eine erleichterte Diffusion unter Beteiligung von Trägermolekülen oder Kanälen als Transportmechanismen vorgeschlagen. Beim Durchtritt durch die Membran von E. coli waren solche Analoga bevorzugt, deren Acylseitenkette nicht größer als die Acetyl-Gruppe war, die hydrophoben Charakter besaßen und mit Halogen - Atomen substituiert waren.

Die Substitution der beiden Chloratome in CAM durch das voluminöse Jodatom in JAM bewirkt eine erhöhte relative Polarisierbarkeit der Kohlenstoff-Halogen Bindung sowie einen stärkeren hydrophoben Charakter des gesamten Moleküls (Korolkovas, 1974). Diese beiden Effekte sind wahrscheinlich die Ursache für den erschwerten Durchtritt von JAM durch die B. stearothermophilus Membran. Allerdings sind auch eine Reihe Chloramphenicol resistenter Mutanten bekannt, deren Resistenz auf einer Veränderung der Membran beruhen soll (Pongs, persönliche Mitteilung). Dies könnte ein Hinweis für CAM Rezeptoren in der Bakterienzellwand sein. Eine eindeutige Klärung dieses Problems muß weiteren Arbeiten überlassen bleiben.

Die hier vorgelegten Daten zeigten, daß ca. 50 % des Reagenzes, das wir in den geernteten und gewaschenen Zellen wiederfanden, an die mit Essigsäure extrahierbaren Proteine gebunden waren (Tab. 3). Außerdem sank die Zahl der überlebenden Zellen nach der Zugabe von CAM zur Bakterienkultur rascher ab als nach Zugabe von JAM (Abb. 26), was bedeutet, daß beide Substanzen einen bakteriziden Effekt auf B. stearothermophilus ausüben und sich damit von den Ergebnissen unterscheiden, die Pongs & Messer (1976) bei E. coli erzielten. Die Zahl der B. stearothermophilus Zellen, die die JAM Behandlung überlebten, hatte erst nach 30 Minuten Inkubationszeit das Niveau der CAM behandelten Bakterien erreicht.

Wenn JAM durch die Zellwand hindurchgetreten und an seinen Wirkort gelangt war, verhielt es sich hinsichtlich seines Effekts auf die Protein- und DNS - Synthese wie CAM (Abb. 25).

Die Frage, welches der spezifische Rezeptor für JAM bei einer in v i v o Inkubation mit B. stearothermophilus ist, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig gelöst werden. Die Versuche A - D (Abb. 27) zeigten jedoch im Vergleich mit den v i t r o markierten B. stearothermophilus Proteinen, daß ribosomale Proteine möglicherweise als

Hauptprodukte an der Reaktion beteiligt sind (Abb. 27, Banden a und g). Bande g sollte von den Ergebnissen der v i t r o Reaktion mit 30S Proteinen dem Protein B-S19 zuzuordnen sein. Das Protein in Bande a könnte man unter Vorbehalt als spezifisches Rezeptorprotein betrachten. Es könnte mit einem 50S Protein in diesen Versuchen vergleichbar sein und wurde bei nicht-letaler Dosis (Abb. 27, Versuch C) am stärksten und bei Vorinkubation mit CAM (Abb. 27, Versuch D) am schwächsten markiert. Die eindeutige Identifizierung dieser Proteine muß weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

N-Jodacetylpuromycin und Monojodamphenicol wurde synthetisiert und unter verschiedenen Bedingungen mit 70S Ribosomen von B. stearothermophilus zur Reaktion gebracht. Die Bindung von N-Jodacetylpuromycin an die 70S Ribosomen wurde durch Vorinkuabtion mit Puromycin stimuliert. N-Jodacetylpuromycin reagierte vor allem mit Protein B-L37/38, das mit Protein E-L32/33 von E. coli korrelierbar und in der ribosomalen "P-site" lokalisiert ist.
Die Bindung von Monojodamphenicol an die 70S Ribosomen wurde ebenfalls durch die Vorinkuabtion mit Puromycin stimuliert. Monojodamphenicol reagierte bevorzugt mit Protein B-L10, das mit Protein E-L11 von E. coli vergleichbar ist und mit Peptidyltransferase-Zentrum lokalisiert ist. Die Modifikation von B. stearothermophilus 70S Ribosomen mit Monojodamphenicol brachte eine signifikante und für diese Reaktion spezifische Inhibierung der GTPase-Aktivität. Die hier vorgelegten Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Befunden über die unmittelbare Nachbarschaft der Peptidyltransferase- und GTPase-Zentren auf den Ribosomen von E. coli und B. stearothermophilus.

In v i v o Inkubation von Monojodamphenicol und Chloramphenicol mit B. stearothermophilus Kulturen zeigte bei unterschiedlicher Dosis ähnliche physiologische Effekte für beide Antibiotika. Die äußere Membran von B. stearothermophilus ist jedoch für Monojodamphenicol schlechter durchlässig als für Chloramphenicol und verfügt möglicherweise über zusätzliche Rezeptoren für beide Pharmaka.
Proteine, die in v i v o mit Monojodamphenicol reagiert hatten, wurden elektrophoretisch aufgetrennt.

6. ABKÜRZUNGEN

aa - tRNS	= aminoacyl - Transfer Ribonukleinsäure
Abb.	= Abbildung
ATP	= Adenosin 5' - Triphosphat
ATPase	= Adenosin 5' - Triphosphat - phosphohydrolase
A_x	= Absorption bei Wellenlänge x
B. stearothermophilus	= Bacillus stearothermophilus
Basen: A	= Adenin
G	= Guanin
T	= Thymin
C	= Cytosin
Ψ	= Pseudouridin
U	= Uracil
CACCA-Leu	= mit Leucin beladenes 3' Oligonukleotid Endfragment einer tRNS
CACCA-LeuAc	= mit N - acetyl-Leucin beladenes 3' Oligonukleotid Endfragment einer tRNS
CAM	= Chloramphenicol
cpm	= Impulse pro Minute (counts per minute)
Chloramphenicol	= D-(-)-threo-1-p-nitrophenyl-2-(dichlor-acetamido)-1,3 propandiol
Chloramphenicol-Base	= D-(-)-threo-1-p-nitrophenyl-2-amino-1,3 propandiol
DNS	= Desoxyribonukleinsäure
DNase	= Desoxyribonuklease
E. coli	= Escherichia coli
EF-G	= Elongationsfaktor G

EF-Tu	= Elongationsfaktor Tu
EF-Ts	= Elongationsfaktor Ts
fMet	= Formylmethionin
f2-mRNS	= RNS des E. coli Phagen f2, die als mRNS in der in v i t r o Proteinsynthese verwendet wird
GTP	= Guanosin 5' - Triphosphat
GTPase	= Guanosin 5' - Triphosphat - phosphohydrolase
JAcPuro	= N-Jodacetylpuromycin
JAM	= Monojodamphenicol
Leu	= Leucin
LeuAc	= N-Acetylleucin
M	= Molar
Monojod [^{14}C] amphenicol	= D-(-)-threo-1-p-nitrophenyl-2-(Jod[$^{14}C_2$]-acetamido)-1,3 propandiol
mRNS	= messenger Ribonukleinsäure
N-Jodacetylpuromycin	= 6-dimethylamino-9-3-(p-methoxy-N-Jodacetyl-L-ß-phenylalanylamino)-3-deoxy-ß-D-ribofuranosyl Purin
P_i	= anorganisches Phosphat
poly (U)	Polyuridylsäure
POPOP	= 1,4 - bis - 2 - (5-Phenyloxazolyl) - Benzol
PPO	= 2,5 - Diphenyloxazol
Puromycin	= 6-dimethylamino-9- 3-(p-methoxy-L-ß-phenylalanylamino)-3-deoxy-ß-D-ribofuranosyl Purin
Pu	= Purin
RNS	= Ribonukleinsäure
S - Wert	= Sedimentationskoeffizient (Svedbergeinheiten)
Sarkosyl	= N - Lauroyl - Sarkosin (Na Salz)
TCA	= Trichloressigsäure

Tris	= Tris-hydroxymethyl-aminomethan (2 - amino - 2 - hydroxy - methylpropan 1,3 - diol)
tRNS	= transfer Ribonukleinsäure
$tRNS_F^{Met}$	= Formylmethionin spezifische Transfer Ribonukleinsäure
$tRNS_M^{Met}$	= Methionin spezifische Transfer Ribonukleinsäure
$tRNS^{Phe}$	= Phenylalanin spezifische Transfer Ribonukleinsäure
U.p.M.	= Umdrehungen pro Minute

6. LITERUATURVERZEICHNIS

Anker, H.S. "A solubilizable acrylamide gel for electrophoresis", FEBS Lett. 7, 293 (1970)

Bald, R., Erdmann, V.A. & Pongs, O. "Irreversible binding of chloramphinicol analogues to E.coli ribosomes", FEBS Lett. 28, 149 - 152 (1972)

Bosch, L. Ed. "The mechanism of protein synthesis and its regulation" North Holland Publ. Comp., Amsterdam (1972)

Brimacombe, R., Morgan, J.M., Cox,R.A. "An improved technique for the analysis of ribonucleoprotein fragments from Escherichia coli 30S ribosomes" Eur. J. Biochem. 23, 52 - 60 (1971)

Cantor, C.R., Pellegrini, M. & Oen, H. "Affinity labeling techniques for examining functional sites of ribosomes" in Ribosomes (Nomura, M., Tissiéres, A. & Lengyel, P. edts.) 573 - 585, Cold Spring Harb. Lab. (1974)

Celma, M.L., Monro, R.E. & Vazquez, D. "Substrate and antibiotic binding sites at the peptidyltransferase centre of E. coli ribosomes", FEBS Lett. 6, 273 - 277 (1970)

Celma, M.L., Monro, R.E. & Vazquez, D. "Substrate and antibiotic binding sites at the peptidyltransferase centre of E. coli ribosomes: Binding of UACCA-Leu to 50S subunits" FEBS Lett. 13, 247 - 251 (1971)

Cohlberg, J.A. & Nomura, M. "Reconstitution of Bacillus stearothermophilus 50S ribosomal subunits from purified molecular components", J. Biol. Chem. 251, 209 - 221 (1976)

Coutsogeorgopoulos, C. "Amino acylaminonucleoside inhibitors of protein synthesis. The effect of aminoacyl ribonucleic acid on the inhibition" Biochemistry 6, 1704 - 1711 (1967)

Cronenberger, J.H. & Erdmann, V.A. "Stimulation of polypeptide polymerization by blocking of free sulphydryl groups in Escherichia coli ribosomal proteins" J. Mol. Biol. 95, 125 - 137 (1975)

Cuatrecasas, P. Wilchek, M. & Anfinsen, C.B. "Affinity labeling of the active site of staphylococcal nuclease", J. Biol. Chem. 244, 4316 - 4329 (1969)

Czernilofsky, A.P. & Kuechler, E. "Affinity label for the tRNA binding site of Escherichia coli ribosomes" Biochim. Biophys. Acta 272, 667 - 671 (1972)

Czernilofsky, A.P., Collatz, E.E., Stöffler, G. & Kuechler, E. "Proteins at the tRNA binding sites of Escherichia coli ribosomes" Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 230 - 234, (1974)

Das, K.H., Goldstein, A. & Kanner, L.C. "Inhibition by chloramphenicol of the growth of nascent protein chains in Escherichia coli" Mol. Pharmacol. 2, 158 - 170 (1966)

Dietrich, S., Schrandt, J. & Nierhaus, K.H. "Interdependence of E. coli ribosomal proteins at the peptidyl transferase centre" FEBS Lett. 47, 136 - 139 (1974)

Eikenberry, E., Bickle, T., Traut, R. & Price, C. "Separation of large quantities of ribosomal subunits by zonal ultrazentrifugation", Eur. J. Biochem. 12, 113 - 116 (1970)

Erdmann, V.A., Fahnestock, S., Higo, K. & Nomura, M. "Role of 5S RNA in the function of 50S ribosomal subunits" Proc. Nat. Acad. Sci, USA 68, 2932 - 2936 (1971)

Erdmann, V.A., Sprinzl, M. & Pongs, O. "Involvement of 5S RNA in the binding of tRNA" Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 942 - 948 (1973)

Expert - Bezancon, A., Guerin, M.F., Hayes, D.H., Legault, L. & Thibault, J. "Preparation of E. coli ribosomal subunits without loss

of biological activity", Biochimie, 56, 77 - 89 (1974)

Fernandez - Munoz, R., Monro, R.E., Torres - Pinedo, R. & Vazquez, D. "Studies on the chloramphenicol, lincomycin and erythromycin sites" Eur. J. Biochem. 23, 185 - 193 (1971)

Forget, B.G. & Weissman, S.M. "Nucleotide sequence of KB cell 5S RNA", Science 158, 1695 - 1699 (1967)

Garrett, R.A. & Wittmann, H.G. "Structure of bacterial ribosomes", Adv. Protein Chem. 27, 277 - 347 (1973)

Goldberg, I.H. & Mitsugi, K. "Inhibition by sparsomycin and other antibiotics of the pruomycin-induced release of polypeptide from ribosomes " Biochemistry 6, 383 - 390 (1967)

Gray, P.N. & Monier, R. "Partial localization of the 5S RNA binding site on 23 S RNA" Biochimie 54, 41 - 46 (1972)

Gurd, F.R.N. "Carboxylmethylation" in Methods of Enzymology (Hirs, C. H.W. edt.) 11, 532 - 541 Academic Press, New York and London (1967)

Hahn, F.E. & Grund, P. "A structural model of the chloramphenicol receptor site" in Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy (Drews, J. and Hahn, F.E. edts), Springer Verlag, Wien, New York (1974)

Hampel, H., Wystup, G. & Nierhaus, K.H. Manuskript in Vorbereitung (1976)

Hardy, S. Kurland, C.G. Voynow, P. & Mora, G. "The ribosomal proteins of E.coli. I. Purification of the 30S ribosomal proteins". Biochemistry 8, 2897 - 2905 (1969)

Harris, R.J., Greenwell, P. & Symons, R.H. "Affinity labeling of ribosomal peptidyl transferase by a puromycin analogue" Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 117 - 124 (1973)

Haselkorn, R., & Rothman - Denes, L. "Protein Synthesis", Ann. Rev. Biochem. 42, 397 - 438 (1973).

Hopps, H.E., Wissemann, C.L., Hahn, F.E., Smadel, J.E. & Ho,R. "Mode of action of chloramphenicol" J. Bact. 72, 561 - 567 (1956)

Horne, J. "Untersuchungen zur Struktur und Funktion von 5S RNS - Protein Komplexen aus Bacillus stearothermophilus und Escherichia coli" Inaugural Dissertation, Fachbereich Biologie (23), der Freien Universität Berlin, (1974)

Horne, J.R. & Erdmann, V.A. "Isolation and characterization of 5S RNA - Protein complexes from B. stearothermophilus and E. coli ribosomes" Molec. gen. Gent. 119, 337 - 344 (1972)

Horne, J.R. & Erdmann, V.A. "ATPase and GTPase activities associated with a specific 5S RNS - protein complex", Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2870 - 2873 (1973)

Hurwitz, C & Braun, C.B. "Temperature - sensivity of the weak bonds by which chloramphenicol is held in intact cells" Biochim. Biophys. Acta 157, 392 - 403 (1968)

Isono, K., Isono, S., Stöffler, G., Visentin, P.L., Yaguchi, M. & Matheson, A.T. "Correlation between 30S ribosomal proteins of Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli", Molec, gen. Gen. 127, 191 - 195 (1973)

Isono, S, & Isono, K. "Purification and charakterization of 30S ribosomal proteins from Bacillus stearothermophilus" Eur. J. Bioch. 50, 483 - 488 (1975)

Kaltschmidt, E. & Wittmann, H.G. "Twodimensional polyacrylamid gel electrophoreses for fingerprinting of ribosomal proteins", Analyt. Biochem. 36, 401 - 412 (1970)

Korolkovas, A. in "Grundlagen der molekularen Pharmakologie und der Arzneimittelentwicklung" Georg Thieme Verlag Stuttgart, 65 - 70 und 181 - 192 (1974)

Lelong, J.C. Gros, D., Gros, F., Bollen, A. Maschler, R. & Stöffler, G. "Function of individual 30S subunits proteins of E. coli. The effect of specific immunoglobulin fragments (Fab) on the activities of ribosomal decoding sites", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 248 ff. (1974)

Lessard, J.L. & Pestka, S. "Studies on the formation of transfer ribonucleic acid ribosome complexes" J. Biol Chem. 247, 6909 - 6912 (1972)

Maaløe, O. & Hanwalt, P.C. "Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle" J.Mol. Biol. 3, 144 - 155 (1961)

Maassen, J.A. & Möller, W. "Identification by photo - affinity labeling of the proteins in Escherichia coli ribosomes involved in elongation factor G - dependent GDP binding" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1277 - 1280 (1974)

Maassen, J.A. & Möller, W. "Comparison by photoaffinity labeling of the proteins involved in GTP -hydrolysis from 70S ribosomes and a 5S RNA Protein complex from Bacillus stearothermophilus" Bich. Biophys. Res. Comm. 64, 1175 - 1183 (1975)

Manyan, D.R., Arimura, G.K. & Yunis, A.A. "Comparative metabolic effects of chloramphenicol analogues", Mol. Pharmacol. 11, 520 - 527 (1975)

Maxwell, R.E. & Nickel, V.S. "The antibacterial activity of the isomers of chloramphenicol", Antibiot. Chemotherap. 4, 289f. (1954)

Messer, W. "Initiation of deoxyribonucleic acid replication in Escherichia coli B/r: Chronology of events and transcriptional control of initiation" J. Bact. 112, 7 - 12 (1972)

Miskin, R. & Zamir, A. "Enhancement of peptidyl transferase activity by antibiotics acting on the 50S ribosomal subunit", J. Mol.Biol. 87 121 - 134 (1974)

Möller, K. & Brimacombe, R. "Specific cross-linking of proteins S7 and L4 to ribosomal RNA by UV-irradiation of Escherichia coli ribosomal subunits", Molec, gen. Genet. 141, 343 - 355 (1975)

Möller, W. "The ribosomal components involved in EF-G and EF-Tu dependent GTP Hydrolysis" in Ribosomes (Nomura, Tissières & Lengyel eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 711 - 731 (1974)

Monro, R.E. "Ribosomal peptidyltransferase: The fragment reaction" in Methods in Enzymology (Moldave K. & Grossman, L eds.) 20, 472 - 481, Academic Press, New York and London (1971)

Monro, R.E. Cerna, J. & Marcker, K.A. "Ribosome - catalyzed peptidyl - transfer: Substrate specifity at the P-site", Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 1042 - 1049 (1968)

Monro, R.E. & Vazquez, D. "Ribosome-catalyzed peptidyl transfer: effects of some inhibitors of protein synthesis" J. Mol. Biol. 28, 161 - 165 (1967)

Moore, P.B. "Reaction of N - ethyl maleimid with the ribosomes of Escherichia coli", J. Mol. Biol. 60, 169 - 184 (1971)

Newton, I. & Brimacombe, R. "Two specific ribonucleoprotein fragments from the 50S sub -particle of Escherichia coli ribosomes" Eur. J. Biochem. 48, 513 - 518 (1974)

Nierhaus, K.H. & Montejo, V. "A protein involved in the peptidyltransferase activity of E. coli ribosomes" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1931 - 1935 (1973)

Nierhaus, D. & Nierhaus, K.H. "Identification of the chloramphenicol - binding protein in Escherichia coli ribosomes by partial reconstitution" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2224 - 2228 (1973)

Nirenberg, M.W.& Matthaei, J.H. "The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides", Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 1588- 16o2 (1961)

Nomura, M., Lengyel, P. & Tissières, A, Edts. "Ribosomes" Monograph Series, Cold Spring Harbor Laboratory (1974)

Parmeggiani, A., Singer, C. & Gottschalk, E.M. "Purification of the amino acid polymerization factors from Escherichia coli" in Methods in Enzymology (Moldave, K. & Grossman, L.eds.) 20, 291 - 3o2 Academic Press, New York and London (1971)

Pestka, S. "Studies on the formation of transfer ribonucleic acid - ribosome complexes", Arch. Biochem. Biophys. 136, 80 - 88 (1970)

Pestka, S. "Inhibitors of ribosome function" in Ann. Rev. Microbiol. 25, 487 - 562 (1971)

Pongs, O., Bald, R., Erdmann, V.A. & Reinwald, E. "Studies on active sites of ribosomes with halocetylated antibiotic analogs" in Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy (Drews, J. & Hahn, F.E. edts.) Springer Verlag, Wien, New York, 179 - 190 (1974)

Pongs, O., Bald, R. & Erdmann, V.A. "Irreversible binding of N-iodoacetylpuromycin to E.coli ribosomes", FEBS Lett. 35, 137 - 140 (1973 a)

Pongs, O., Bald, R. & Erdmann, V.A. "Identification of chloramphenicol-binding protein in Escherichia coli ribosomes by affinity-labeling" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2229 - 2233 (1973 b)

Pongs, O. & Lanka, E. "Affinity labeling of the ribosomal decoding site with an AUG - substrate analog", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1505 - 1509 (1975)

Pongs, O. & Messer, W. "The chloramphenicol receptor site in Escherichia coli, in v i v o affinity labeling by monoiodoamphenicol" J. Mol. Biol. 101, 171 - 184 (1976)

Pongs, O., Nierhaus, K.H. Erdmann, V.A. & Wittmann, H.G. "Acitve sites in Escherichia coli ribosomes" FEBS Lett. 40 Suppl., 28 - 37 (1974)

Richter, D., Erdmann, V.A. & Sprinzl, M. "A new transfer RNA fragment reaction: TpΨpCpGp bound to a ribosom-messenger RNA complex induces the synthesis of guanosin tetra- and pentaphosphates" Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3226 - 3229 (1974 a)

Richter, D. Erdmann, V.A. & Sprinzl, M. "The biological function of the TpΨpCpGp loop (loop IV) of tRNS in various ribosome-dependent reactions" Acta biol. med. germ. 33, 609 - 611 (1974 b)

Richter, D., Erdmann, V.A. & Sprinzl, M. "Specific recognition of the GTΨC loop (loop IV) of tRNA by 50S ribosomal subunits from E. coli" Nature New Biol. 246, 132 - 135 (1973)

Rebstock, M. "Chloramphenicol. IX. Some analogs having variations of the acyl group",J.Amer. Chem. Soc. 72, 4800 - 4803 (1950)

Schrier, P.J. & Möller, W. "The involvement of 50S ribosomal protein L11 in the EF-G dependent GTP Hydrolysis of E. coli ribosomes" FEBS Lett. 54, 130 - 134 (1975)

Stahl, J., Dressler, K. & Bielka, H. "Studies on proteins of animal ribosomes XVIII. Affinity labeling of rat liver ribosomes by N-bromo-acetylpuromycin" FEBS Lett. 47 , 167 - 170 (1974)

Tanaka, K., Teraoka, H. & Tamaki, M. "Peptidyl puromycin synthesis; effect of several antibiotics, which act on 50S ribosomal subnunits" FEBS Lett. 15, 249 - 253 (1971)

Tischendorf, G.W., Zeichardt, H. & Stöffler, G. "Architecture of the Escherichia coli ribosome as determined by immuno electron microscopy",

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4820 - 4824 (1975)

Traub, P., Mizushima, S. Lowry, C.V. & Nomura, M. "Reconstitution of ribosomes from subribosomal components" in Methods in Enzymology (Moldave, K. & Grossman, L. eds.) 20, 391 - 4o7, Academic Press, New York and London (1971)

Traut, R.R. & Haenni, A.L. "The effect of sulfhydryl reagents on ribosome activity" Eur. J. Biochem. 2 , 64 - 73 (1967)

Vazquez, D. "Inhibitors of protein synthesis", FEBS Lett. 40, Suppl. 63 - 84 (1974)

Vazquez, D., Barbacid, M. & Fernandez - Munoz "Antibiotic action on the ribosomal peptidyl transferase centre" in Drug Receptor Interactions in Antimicrobial Chemotherapy (Drews, J. and Hahn. F.E. edts.), Springer - Verlag, Wien, New York (1975)

Wittmann, H.G. "Strucure, Function and Evolution of Ribosomes", Eur. J. Biochem. 61, 1 - 13 (1976)

Wolfe, A.D. & Hahn, F.E. "Mode of action of chloramphenicol" Biochem. Biophys. Acta 95, 146 - 155 (1965)

Wrede, P. & Erdmann, V.A. "Activities of Bacillus stearothermophilus 50S ribosomes reconstituted with prokaryotic and eukaryotic 5S RNA", FEBS Lett. 33, 315- 319 (1973)

Yaguchi, M. "Primary structure of protein S18 from the small Escherichia coli ribosomal subunit" FEBS Lett. 59, 217 - 220 (1975)

Yaguchi, M., Matheson, A.T. & Visentin, L.P. "Procaryotic ribosomal proteins: N - terminal sequence homologies and structural correspondence of 30S ribosomal proteins from Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus", FEBS Lett. 46, 296 - 299 (1974)

Yukioka, M., Takumi, H. & Morisawa, S. "Affinity labeling of the ribonucleic acid component adjacent to the peptidyl recognition centre of peptidyl transferase in Escherichia coli ribosomes", Biochem.Biophys. Acta 390, 192-2o8 (1975)

LEBENSLAUF

Am 9. Mai 1945 wurde ich als ältester Sohn des Oberstleutnants i.D. Roland Wischnath und seiner Ehefrau Hilde, geborener Gronebaum, in Gütersloh, Westfalen geboren. Im April 1951 wurde ich eingeschult, besuchte fünf Jahre lang die Volksschule, vier Jahre lang die Realschule in meiner Heimatstadt und wechselte 1960 über zum Friedrich von Bodelschwingh - Gymnasium in Bethel bei Bielefeld. Dort legte ich 1966 die Reifeprüfung ab.

Vom April 1966 bis März 1968 absolvierte ich meinen Militärdienst mit der Ausbildung zum Reserveoffizier im Fernmelde Lehr-Bataillon, Starnberg. Unmittelbar danach begann ich mit meinem pharmazeutischen Praktikum in der Adler Apotheke in Berlin, Spandau, das ich im März 1970 mit dem Vorexamen abschloß.

Vom Sommersemester 1970 bis einschließlich Wintersemester 1972/73 studierte ich Pharmazie am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität, Berlin und legte dort im Mai 1973 mein Staatsexamen ab. Von September 1973 bis Mai 1976 arbeitete ich in der Abteilung von Herrn Prof. H.G. Wittmann am Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin - Dahlem, an meiner Dissertation.